

**ZUM MECHANISMUS DER AUTOKATALYTISCHEN
FERRIHAEMOGLOBINBILDUNG DURCH
DIMETHYLANILINOXID:
STRUKTUR, WIRKUNG UND
BIOTRANSFORMATION VON
2-DIMETHYLAMINO-4-
(METHYL-PHENYLAMINO)-PHENOL**

Harald Gaber

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ZUM MECHANISMUS DER AUTOKATALYTISCHEN FERRIÄMO-
GLOBINBILDUNG DURCH DIMETHYLANILINOXID:
STRUKTUR, WIRKUNG UND BIOTRANSFORMATION VON
2-DIMETHYLAMINO-4-(METHYL-PHENYLAMINO)-PHENOL.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie und
Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Harald Gaber



M ü n c h e n

1975

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Kiese
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Wagner
- Tag der mündlichen Prüfung: 4. 6. 1975



Meiner Frau
gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. <u>EINLEITUNG</u>	1
B. <u>ERGEBNISSE</u>	6
I. Untersuchungen zur Aufklärung der Struktur der in der Reaktion zwischen Dimethylanilin- oxid und Ferrihämoglobin oder Ferricytochrom c gebildeten Leukoverbindung des purpurnen Farbstoffs	6
1. Synthesen	6
2. ESR-spektrometrische Untersuchungen	7
3. Untersuchungen mit 4-Brom-dimethylanilin- oxid	8
4. NMR-spektrometrische Untersuchungen	9
5. Oxidation der Leukoverbindung und ihres 3, 5-Dinitrobenzoylestern	13
6. Röntgenstrukturanalytische Untersuchungen..	14
II. Untersuchungen der Reaktion zwischen DMPAP und Hämoglobin in vitro	16
1. Bildung von Ferrihämoglobin im Blut vom Mensch, Hund, Rind und Kaninchen.....	16
2. Abnahme von DMPAP im Blut vom Hund	23
3. Isolierung der Produkte der Reaktion zwischen DMPAP und Hämoglobin	23
III. Wirkungen von DMPAP in vivo	27
1. Bestimmung der Toxizität	27
2. Ferrihämoglobinbildung in vivo	27
a) Dosis-Wirkungskurve	27
b) Kinetik der Ferrihämoglobinbildung in vivo.	29

3.	Veränderungen im Blutbild	29
4.	Weitere Wirkungen	31
5.	Mikroskopische Untersuchungen der Organe..	31
IV.	Untersuchungen der Biotransformation von DMPAP in vivo	34
1.	Verteilung der Radioaktivität im Blut, Harn und in den Organen	34
2.	Isolierung von Reaktionsprodukten aus dem Harn	38
a)	Isolierung von Aminen	39
b)	Isolierung der nicht mit Äther extrahier- baren Stoffwechselprodukte	39
c)	Untersuchungen zur Aufklärung der Struktur des isolierten wasserlöslichen Stoffwechselproduktes	41
C.	<u>DISKUSSION</u>	45
D.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	49
E.	<u>EXPERIMENTELLER TEIL</u>	50
1.	Synthesen bzw. Herkunft der Substanzen	50
2.	Methoden, Materialien, Geräte	62
F.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	66

A. EINLEITUNG

Die erste autokatalytische pharmakologische Wirkung wurde von HEUBNER und JUNG 1941-42 (18) entdeckt. Sie beobachteten, daß die Bildung von Ferrihämoglobin durch Chlorat mit zunehmender Ferrihämoglobinkonzentration ansteigt, und daß das zunächst nur in geringer Konzentration vorhandene Ferrihämoglobin die Reaktion einleitet. Der Mechanismus der katalytischen Wirkung von Ferrihämoglobin konnte jedoch nicht aufgeklärt werden.

Untersuchungen von TERAYAMA 1963 (58, 59) KIESE, RAUSCHER, WEGER 1966 (31), UEHLEKE 1966 (60), KIESE 1967 (32), KIESE, RENNER und SCHLÄGER 1971 (35) und RENNER (1975 in Vorbereitung) ergaben, daß die N-Oxide von 4-Dimethylamino-azobenzol, N,N-Dimethylanilin, 4-Fluor-, 4-Chlor- und 4-Brom-N,N-dimethylanilin Hämoglobin zu Ferrihämoglobin oxidieren. Dabei war eine langsame Anfangsgeschwindigkeit und eine Geschwindigkeitszunahme der Ferrihämoglobinbildung charakteristisch.

Die Oxidation von Hämoglobin zu Ferrihämoglobin durch Dimethylanilinoxid wurde von KIESE (32) als eine autokatalytische Reaktion erkannt, bei der Ferrihämoglobin der Katalysator ist. Der Mechanismus der Reaktion wurde von KIESE, RENNER und SCHLÄGER (35) untersucht.

Ihre Untersuchungen führten zur Isolierung und Identifizierung der in Abb. 1 angegebenen Substanzen, die aus Dimethylanilinoxid (I) in seiner Reaktion mit Ferrihämoglobin oder sekundär aus den Reaktionsprodukten entstehen und von denen die Verbindungen V, VI, die Leukoverbindung sowie der purpurne Farbstoff in Gegenwart von molekularem Sauerstoff Hämoglobin zu Ferrihämoglobin oxidieren.

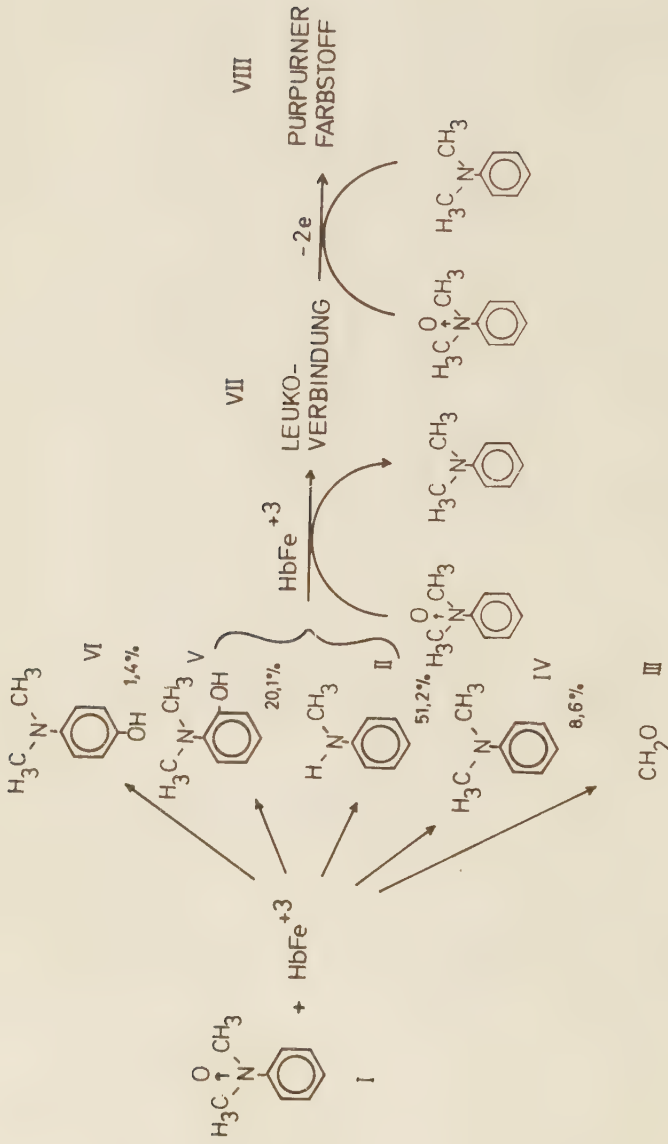


Abb. 1: Umsetzung von Dimethylanilinoxid und Bildung von Reaktionsprodukten in Lösungen von Ferrihämoglobin oder Ferricytochrom c. Konzentrationen der Reaktionsprodukte in % des umgesetzten Dimethylanilinoxids in Lösungen von 10⁻² M Dimethylanilinoxid und 5 x 10⁻⁵ M Ferricytochrom c in 0,1 M Phosphatpuffer; pH 6,5 nach 1 Stunde Inkubation an der Luft bei 37°C.

Die Untersuchungen zeigten auch, daß Ferricytochrom c das Ferrihämoglobin in seiner Reaktionsfähigkeit mit Dimethylanilinoxid übertrifft. Beide Ferrihämoproteine verursachen die Bildung von N-Methylanilin (II) und Formaldehyd (III) zusätzlich zu N,N-Dimethylanilin (IV) und den ferrihämoglobinbildenden Derivaten 2-Dimethylamino-phenol (V), 4-Dimethylamino-phenol (VI) sowie die Bildung eines instabilen Hämoglobin oxidierenden purpurnen Farbstoffs und in geringer Menge dessen Leukoverbindung.

Der purpurne Farbstoff, der eine wichtige Rolle bei der Ferrihämoglobinbildung durch Dimethylanilinoxid spielt, entzog sich wegen seiner Unbeständigkeit der Aufklärung der Struktur. Sie wurde erst der weiteren Untersuchungen zugänglich, als sich die durch Reduktion mit H_2S gewonnene Leukoverbindung als eine stabile, leicht kristallisierende Substanz erwies.

Der purpurne Farbstoff wurde von RENNER (50) aus Inkubaten von Dimethylanilinoxid und Cytochrom c durch Säulenchromatographie an einer mit Sephadex C 25 gefüllten Säule isoliert und durch Reduktion in die farblose Leukoverbindung, Fp. $76^{\circ}C$, übergeführt.

Zu Beginn der eigenen Untersuchungen war über die Leukoverbindung folgendes bekannt:

Die Absorptionsmaxima der Leukoverbindung in ätherischer Lösung (C) lagen bei 246 und 283,5 nm, in 1N salzsaurer Lösung (B) bei 277 und 225 nm und in 1N Natronlauge (A) bei 309 nm.

Elementaranalyse und Massenspektroskopie ergaben übereinstimmend die Summenformel $C_{15}H_{18}N_2O$ und das Molekulargewicht 242. Die Verschiebung des Signals im Massenspektrum von 242 (Molekülion) nach 243 in Gegenwart von Deuteromethanol zeigte, daß das Molekül nur ein gegen Deuterium austauschbares aktives H-Atom enthält. Aus alkalischer Lösung der Leukoverbindung wurde N-Methylanilin als Komponente des Moleküls identifiziert.

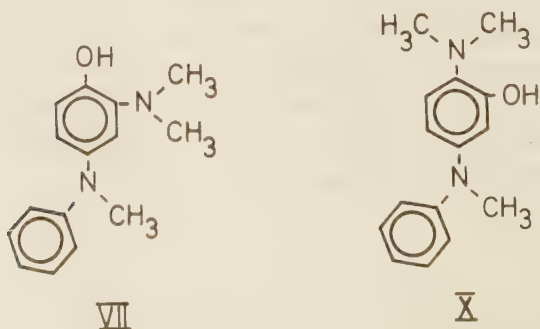
Nachdem von der Leukoverbindung das Molekulargewicht, die Summenformel sowie N-Methylanilin als Komponente ihres Moleküls bekannt waren, war 2-Dimethylamino-phenol als zweite Komponente zu vermuten.

NMR-Spektren der Leukoverbindung bestätigten diese Vermutung. Da nur der Wasserstoff der OH-Gruppe gegen Deuterium ausgetauscht wurde, mußte der Stickstoff der N-CH₃-Gruppe von N-Methylanilin tertiär gebunden sein.

Die Zuordnung der Schwingungsbanden im IR zeigen die Leukoverbindung als eine Substanz, die aus einem monosubstituierten und vermutlich aus einem 1,2,4-trisubstituierten Ring besteht und die Schwingungsbande der OH-Gruppe zeigt. Die Schwingungsbande für NH konnte nicht ausgemacht werden. Die 1,2,4-Trisubstitution wurde durch IR-Spektren des purpurnen Farbstoffs, dem Oxidationsprodukt der Leukoverbindung bestätigt.

Nach diesen Ergebnissen entsteht die Leukoverbindung durch Kondensation aus den Reaktionsprodukten N-Methylanilin und 2-Dimethylamino-phenol, was durch oxidative Kondensation der beiden Komponenten durch Kaliumdichromat in saurer Lösung bewiesen werden konnte.

Zwei Strukturen, nämlich 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol (VII) und 3-(Methyl-phenylamino)-6-dimethylamino-phenol (X) entsprechen den angeführten Daten.



Welche Struktur - VII oder X - der Leukoverbindung zuzuordnen ist, soll in dieser Arbeit geklärt werden. Gegenstand dieser Arbeit ist auch die Untersuchung der Ferrihämoglobinbildung durch die Leukoverbindung im Vergleich mit 2- und 4-Dimethylamino-phenol in vitro und in vivo, sowie die Biotransformation der Leukoverbindung nach intravenöser Injektion am Hund.

Die Arbeit soll außerdem klären, ob die Leukoverbindung als Ferrihämoglobinbildner für die Therapie der Cyanidvergiftung Anwendung finden kann, nachdem 4-Dimethylamino-phenol bereits aufgrund seiner raschen Ferrihämoglobinbildung durch KIESE und WEGER (28, 29, 30, 34, 40, 63, 64) als Antidot gegen die Blausäurevergiftung eingeführt wurde.

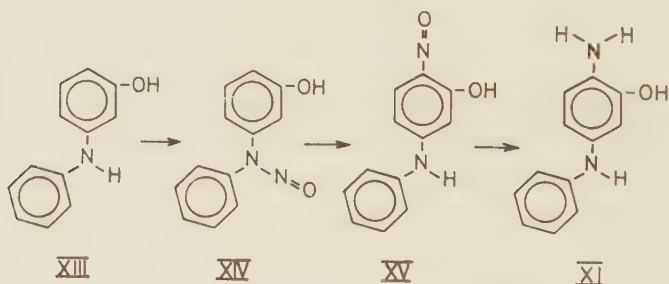
B. ERGEBNISSE

I. Untersuchungen zur Aufklärung der Struktur der in der Reaktion zwischen Dimethylanilinoxid und Ferrihämoglobin oder Ferri-cytochrom c gebildeten Leukoverbindung des purpurnen Farbstoffs

1. Synthesen

Unsere Untersuchungen, die entscheiden sollten, welche Struktur - VII oder X - der Leukoverbindung zuzuordnen ist, begannen mit Versuchen, eine dieser Verbindungen zu synthetisieren.

Zunächst wurde versucht 2-Hydroxy-N, N, N'-trimethyl-N'-phenyl-phenylendiamin-(1, 4) (X) aus 3-Hydroxy-diphenylamin (XIII) herzustellen.

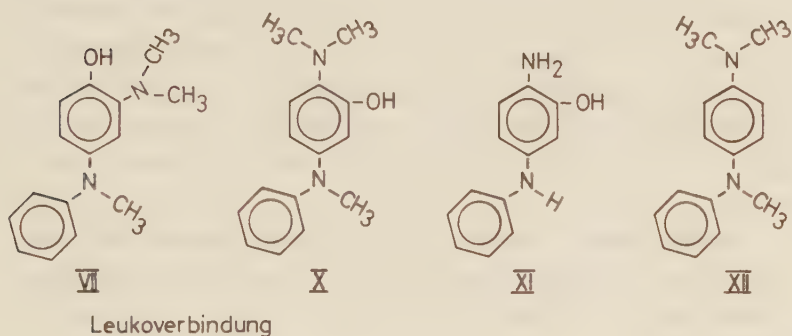


Die Methylierung des sehr instabilen 2-Hydroxy-N'-phenyl-phenylendiamins-(1, 4) (XI) führte trotz zahlreicher und unterschiedlicher Methylierungsversuche (11, 21, 38, 49, 66, 67) nicht zu 2-Hydroxy-N, N, N'-trimethyl-N'-phenyl-phenylendiamin-(1, 4) (X).

Auch die Versuche diese Substanz durch Kondensation von 2-Dimethyl-amino-5-brom-phenol und 2-Dimethylamino-5-fluor-phenol, sowie deren Phenylacetate mit N-Methylanilin oder N-Methyl-natriumanilid zu erhalten, führten nicht zur gewünschten Verbindung (14, 61).

Da die Leukoverbindung in guten Ausbeuten durch oxidative Kondensation von 2-Dimethylamino-phenol und N-Methylanilin mit Kaliumdichromat über den Farbstoff hergestellt werden konnte, wurde versucht die Struktur dieser Substanz mit chemischen und physikalisch-chemischen Methoden zu klären.

2. ESR-spektrometrische Untersuchungen der Oxidationsprodukte von der Leukoverbindung, von 2-Hydroxy-N'-phenyl-phenylen-diamin-(1, 4) und von N, N, N'-Trimethyl-N'-phenyl-phenylen-diamin-(1, 4)



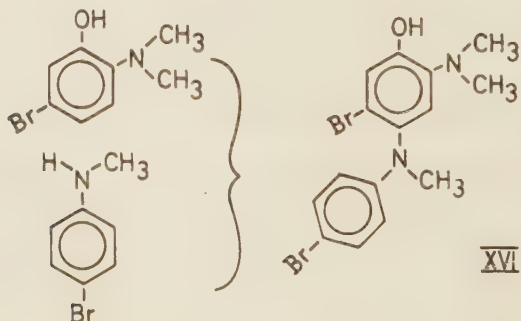
Werden die diamagnetischen Substanzen VII bzw. X, XI, und XII in 1/N salzsaurer Lösung mit zunehmenden Mengen K-Dichromat versetzt, so zeigen nur die p-Phenylendiamine XI und XII paramagnetische Signale. Nur sie werden durch monovalente Oxidation in Farbstoffradikale übergeführt, die durch weiteren Elektronenentzug wieder diamagnetisch werden. Die Leukoverbindung dagegen wird offenbar divalent zu dem purpurnen Farbstoff oxidiert. Ein paramagnetisches Signal tritt hier nicht auf.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Leukoverbindung die Struktur des m-Phenylendiamins VII zuzuordnen ist.

3. Untersuchungen mit 4-Brom-dimethylanilinoxid

Wie in der Arbeit über Reaktionen von 4-Halogen-dimethylanilinoxid und Hämoglobin oder Cytochrom c von RENNER (1975 in Vorbereitung) (51) mitgeteilt wird, werden in Inkubaten von 4-Brom-dimethylanilinoxid und Cytochrom c entsprechende primäre Reaktionsprodukte gebildet wie in Inkubaten von Dimethylanilinoxid und Cytochrom c. Ein Farbstoff, wie er in Inkubaten von Dimethylanilinoxid und Cytochrom c sekundär aus den Reaktionsprodukten 2-Dimethylamino-phenol und N-Methylanilin über die Leukoverbindung des Farbstoffs, siehe Abb. 1, gebildet wird, entsteht im Inkubat von 4-Brom-dimethylanilinoxid nicht. Dafür scheidet sich ein farbloser Niederschlag aus dem Reaktionsgemisch ab, der eine Substanz enthält, die in gelöster Form mit Dichromat einen instabilen blauen Farbstoff bildet. Die Aufklärung der Struktur dieser Leukoverbindung führte zu dem m-Phenylendiaminderivat (XVI), das sekundär aus den Reaktionsprodukten 2-Dimethylamino-5-brom-phenol und 4-Brom-N-Methylanilin gebildet wird.

Das Ergebnis dieser Untersuchung spricht dafür, daß auch der Leukoverbindung als Kondensationsprodukt aus 2-Dimethylaminophenol und N-Methylanilin die Struktur eines m-Phenylendiamins zugeordnet werden kann.



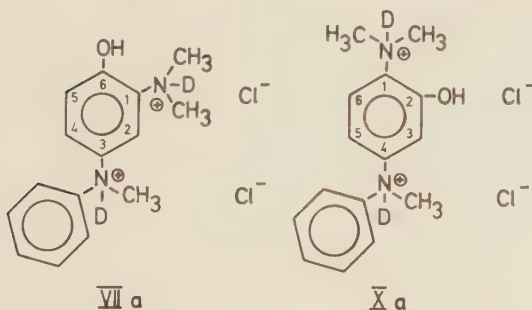
4. NMR-spektrometrische Untersuchungen des Di-Deuteriochlorids der Leukoverbindung in d_4 -Methanol

Das NMR-Spektrum des Di-Deuteriochlorids der Leukoverbindung in d_4 -Methanol zeigt gegenüber dem Spektrum der Leukoverbindung in d_4 -Methanol eine geringe Verschiebung der aromatischen Protonen nach tieferem Feld. Charakteristisch ist die am stärksten erfolgende Verschiebung eines Singulets.

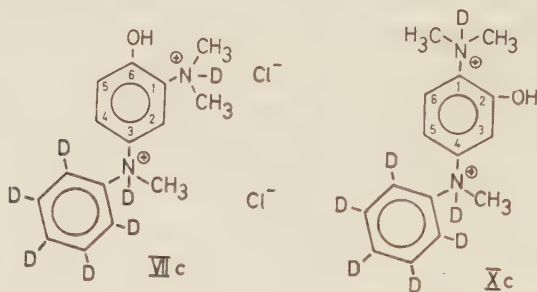
Aus den beiden für die Leukoverbindung infrage kommenden Strukturen zeigt sich an den Formelbildern der entsprechenden Di-Deuteriochloride, daß dieses Singulett eigentlich nur dem Proton in Stellung 2 der Struktur VIIa zugeordnet werden kann, da es durch die beiden Ammoniumgruppen das mit Abstand am stärksten beeinflusste aromatische Proton ist.

Die Protonen in den Stellungen 3, 5 und 6 der Struktur Xa unterscheiden sich in ihrer Beeinflussung durch die Ammoniumgruppen nicht so stark, daß etwa dem Proton in Stellung 6 diese relativ starke Verschiebung zugeordnet werden könnte.

Auch diese Untersuchungen deuten eher auf die Struktur eines m-Phenylendiamins, als auf die eines p-Phenylendiamins hin.



NMR-spektrometrische Untersuchungen von der am monosub-
stituierten Ring deuterierten d₅-Leukoverbindung und ihres
Di-Deuteriochlorids in d₄-Methanol



Da nach Deuterieren des monosubstituierten Ringes in der Leukoverbindung nur noch die Signale der 3 Protonen am trisubstituierten Ring zu erwarten sind, sollte die Struktur der Leukoverbindung eigentlich durch die NMR-Spektroskopie entschieden werden können (Abb. 2).

Das NMR-Spektrum von dem Di-Deuteriochlorid der d₅-Leukoverbindung zeigt gegenüber dem Spektrum der d₅-Leukoverbindung in d₄-Methanol eine Verschiebung der 3 Protonensignale nach tieferem Feld. Das am stärksten verschobene Signal eines aromatischen Protons zeigt eine m- und eine p-Koppelung (Abb. 3) und kann wegen dieser Eigenschaften nur dem Proton in Stellung 2 der Struktur VIIc oder dem Proton in Stellung 3 der Struktur Xc zugeordnet werden. Die Entscheidung fällt für das durch die Ammoniumgruppen mit Abstand am stärksten beeinflusste Proton in Stellung 2 der Struktur VIIc.

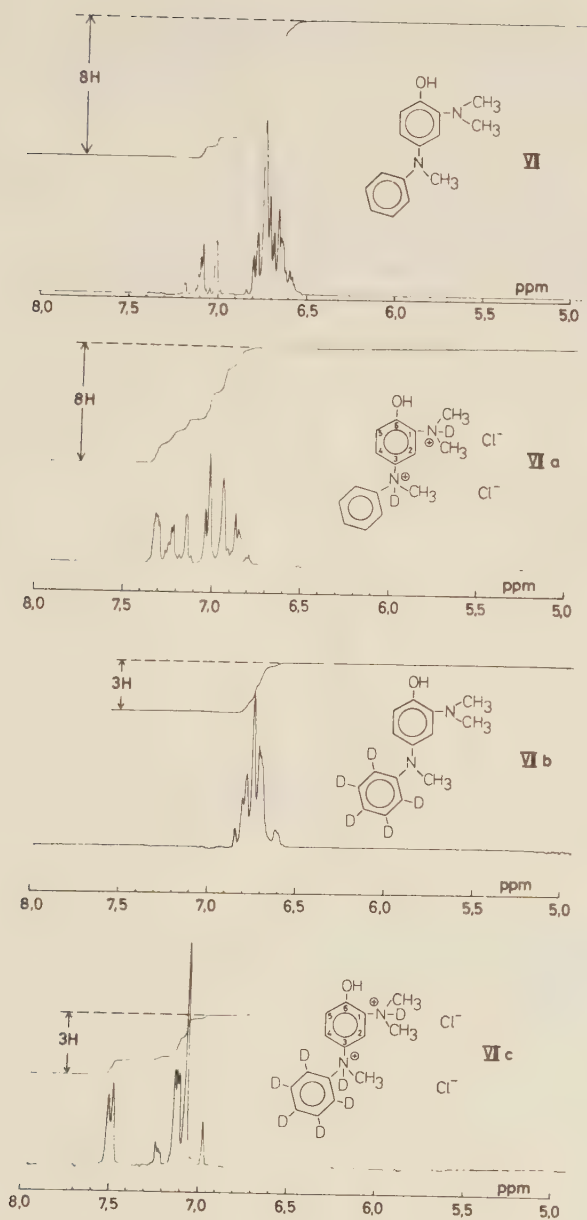


Abb. 2: NMR-Signale der aromatischen Protonen von 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenyl-amino)-phenol (VII), seines Dideuterchlorids (VIIa), von der am monosubstituierten Ring deuterierten Verbindung (VIIb) und dessen Dideuterchlorids (VIIc).

Die Beeinflussung des Protons in Stellung 3 der Struktur Xc durch die Ammoniumgruppen unterscheidet sich nicht so wesentlich von der Beeinflussung der Protonen in den Stellungen 5 und 6, daß dieses Signal diesem Proton zugeschrieben werden könnte.

Da die Signale der beiden Protonen in den Stellungen 4 und 5 der Struktur VIIc nicht aufgetrennt wurden, können sie zur Entscheidung der Struktur der Leukoverbindung nicht beitragen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen führen ebenfalls zu der Aussage, daß der Leukoverbindung mit größter Wahrscheinlichkeit die Struktur VII, also des m-Phenylendiamins zuzuordnen ist.

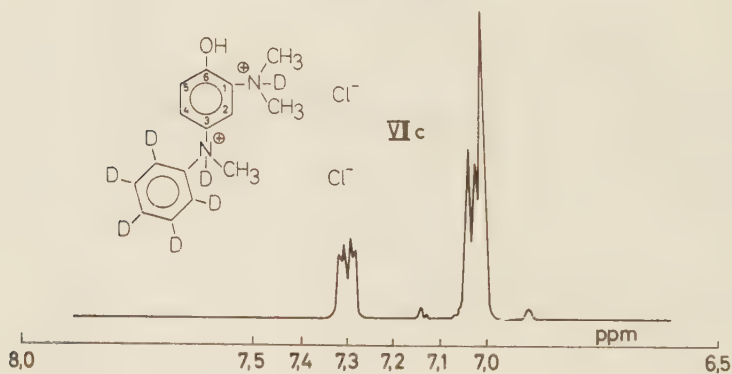
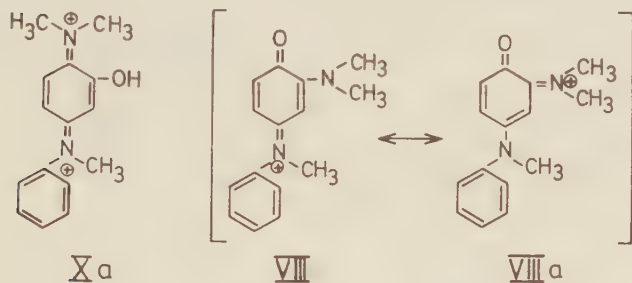


Abb. 3: NMR-Signale der 3 aromatischen Protonen des Dideuterochlorids der d₅-Leukoverbindung (VIIc)

5. Oxidation der Leukoverbindung und ihres 3,5-Dinitro- benzoylestere

Neutrale oder salzsaure Lösungen von der Leukoverbindung in Wasser, Aceton oder Dioxan werden durch Dichromat sofort purpurn gefärbt. Als Oxidationsprodukt der Leukoverbindung ist dem Farbstoff vermutlich die Struktur VIII, VIIla oder Xa zuzuordnen.

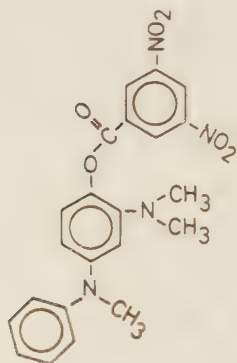


Für die Untersuchungen mit dem Farbstoff wurde dieser durch Oxidation des Dihydrochlorids der Leukoverbindung mit Kaliumdichromat hergestellt (siehe Teil E).

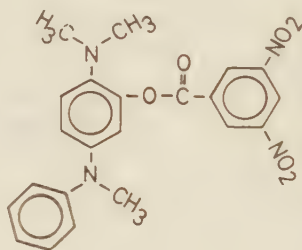
Dem NMR-Spektrum des Farbstoffs in Deuteriochloroform konnte wegen der geringen Löslichkeit des Farbstoffs in Chloroform nur entnommen werden, daß im Molekül eine Dimethylaminogruppe und wahrscheinlich eine Methylaminogruppe enthalten ist. Die Methylaminogruppe wurde durch Auffinden von N-Methylanilin durch alkalische Hydrolyse des Farbstoffs bestätigt.

Dem IR-Spektrum war eine Mono- und eine 1,2,4-Trisubstitution zu entnehmen.

Wird durch Veresterung der OH-Gruppe der Leukoverbindung die Substanz VII d gebildet, so kann diese durch Oxidation keinen Farbstoff mehr vom Typ eines Chinonimins bilden. Entsteht die Verbindung X d, so kann durch Oxidation trotzdem ein Farbstoff, nämlich ein p-Chinondiimin entstehen.



VII d



X d

Da aber nach Versetzen des synthetisierten 3, 5-Dinitrobenzoyl-esters der Leukoverbindung mit Oxidationsmittel wie Kaliumdichromat und H_2O_2 in neutraler oder saurer Lösung kein Farbstoff gebildet wird, kann es sich bei dem Ester nur um das Produkt VII d handeln. Der Leukoverbindung wäre demnach die Struktur VII, also die des m-Phenylendiamins zuzuordnen.

6. Röntgenstrukturanalytische Untersuchungen⁻¹⁾

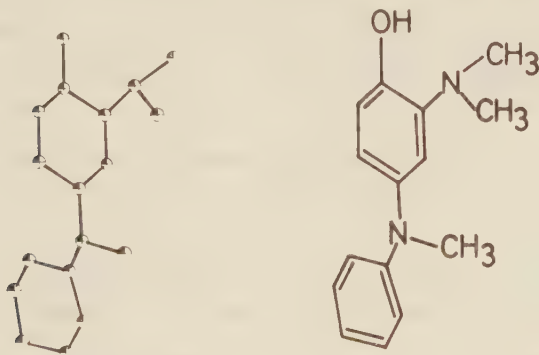
Röntgenstrukturuntersuchungen von Kristallen der Leukoverbindung mit der Abmessung $0,8 \times 0,1 \times 0,05$ mm ergaben eine monokline Elementarzelle der Raumgruppe $P2_1$ mit den Abmessungen

⁻¹⁾ Die Röntgenstrukturanalyse wurde von Herrn Dr. H. Lotter, Max-Planck-Institut für Biochemie, München, angefertigt.

$a = 11,43 \text{ \AA}$; $b = 22,71 \text{ \AA}$; $c = 5,82 \text{ \AA}$ und dem Winkel von $116,85^\circ$. Das spezifische Gewicht von 1,205 wurde nach der Schwebemethode bestimmt. Die ermittelten Daten ergeben, daß sich in der Elementarzelle 4 Moleküle der Leukoverbindung befinden.

Auf einem Einkristallrefraktometer wurden 1684 unabhängige Reflexe vermessen. Mit sogenannten direkten Methoden wurden von den 296 höchsten Strukturfaktoren die Phasen bestimmt. Eine Fouriersynthese mit diesen 296 Strukturfaktoren zeigte sehr klar die Struktur des Moleküls (Abb.).

Die 18 höchsten Elektronendichtepeaks waren sinnvoll als Atome interpretierbar, womit sämtliche Atomlagen bestimmt waren.



Die Untersuchungen zur Aufklärung der Struktur der in der Reaktion zwischen Dimethylanilinoxid und Ferrihämoglobin oder Ferricytochrom c gebildeten Leukoverbindung des purpurnen Farbstoffs ergeben eindeutig, daß die Verbindung durch oxidative Kondensation der primären Reaktionsprodukte N-Methylanilin und 2-Dimethylamino-phenol entsteht und ihr die Struktur des 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol (DMPAP) UPAC: 2-Dimethylamino-4-(N-methyl-anilino)-phenol bzw. des 6-Hydroxy-N, N'-trimethyl-N'-phenyl-phenylendiamin-(1,3) zuzuordnen ist.

II. Untersuchungen der Reaktion zwischen 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol und Hämoglobin in vitro

1. Bildung von Ferrihämoglobin im Blut von Mensch, Hund, Rind und Kaninchen

Die Untersuchung der Bildung von Ferrihämoglobin durch DMPAP erfolgte im Vergleich mit 2-Dimethylamino-phenol, einer Komponente der Leukoverbindung und mit 4-Dimethylamino-phenol, der Substanz, die wegen ihrer besonders schnellen Ferrihämoglobinbildung bei der Blausäuretherapie Anwendung findet.

4×10^{-4} Mol 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol bildeten im Blut vom Mensch nach 20 min maximal 30,5% Ferrihämoglobin (Tabelle 1). Dieselbe Konzentration DMPAP bildete im Hundeblut 53,6%, im Rinderblut 36,1% nach jeweils 60 min und im Blut vom Kaninchen 11,2% Ferrihämoglobin nach 20 min.

Der größte Speciesunterschied in der Bildung von Ferrihämoglobin ergab sich durch 2-Dimethylamino-phenol.

So bildeten 4×10^{-4} Mol 2-Dimethylamino-phenol jeweils nach 60 min im Menschenblut maximal 8,1%, im Hundeblut 75,6%, im Rinderblut 14,2% und im Blut von Kaninchen maximal 2,3% Ferrihämoglobin.

4-Dimethylamino-phenol bildete in der Konzentration von 4×10^{-4} Mol maximal zwischen 26,2% Ferrihämoglobin im Menschenblut und 39,8% im Kaninchenblut.

Die maximale Ferrihämoglobinkonzentration war durch 4-Dimethylamino-phenol viel schneller erreicht als durch die beiden anderen Aminophenole. Bereits nach 3 min war im Blut vom Mensch und Hund, nach 10 min im Blut vom Rind und Kaninchen die maximale Bildung von Ferrihämoglobin erfolgt.

Tabelle 1

Ferrihämoglobinbildung im Blut verschiedener Species durch:
2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol
2-Dimethylamino-phenol
4-Dimethylamino-phenol

Versuche in vitro; Konzentration $4 \cdot 10^{-4}$ M

Als Maß ist die maximale Ferrihämoglobinbildung (MFB) in %
und die Zeit bis zur MFB angegeben.

	Mensch		Hund		Rind		Kaninchen	
	MFB %	Zeit min	MFB %	Zeit min	MFB %	Zeit min	MFB %	Zeit min
2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol	30, 5	20	53, 6	60	36, 1	60	11, 2	20
2-Dimethylamino-phenol	8, 1	60	75, 6	60	14, 2	60	2, 3	60
4-Dimethylamino-phenol	26, 2	3	31, 6	3	33, 4	10	39, 8	10



Abb. 4: Bildung von Ferrihämoglobin im Blut vom Mensch (o), Hund (■), Rind (Δ) und Kaninchen (□) durch 2-Dimethyl-amino-4-(methyl-phenylamino)-phenol in vitro. Konzentration 4×10^{-4} M; Temperatur 37°C ; Die Marken sind Mittel aus je 6 Bestimmungen.

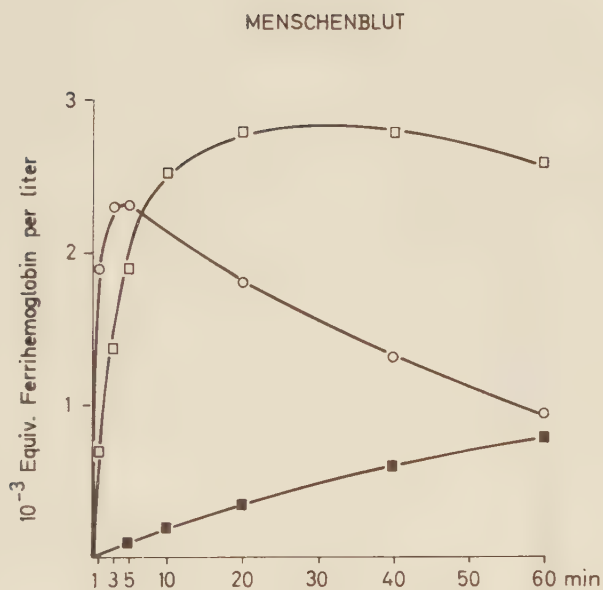


Abb. 5: Bildung von Ferrihämoglobin im Blut vom Mensch durch 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol (□), 2-Dimethylamino-phenol (■) und 4-Dimethylamino-phenol (○) in vitro.

Konzentration 4×10^{-4} M; Temperatur 37°C ;

Die Marken sind Mittel aus je 6 Bestimmungen.

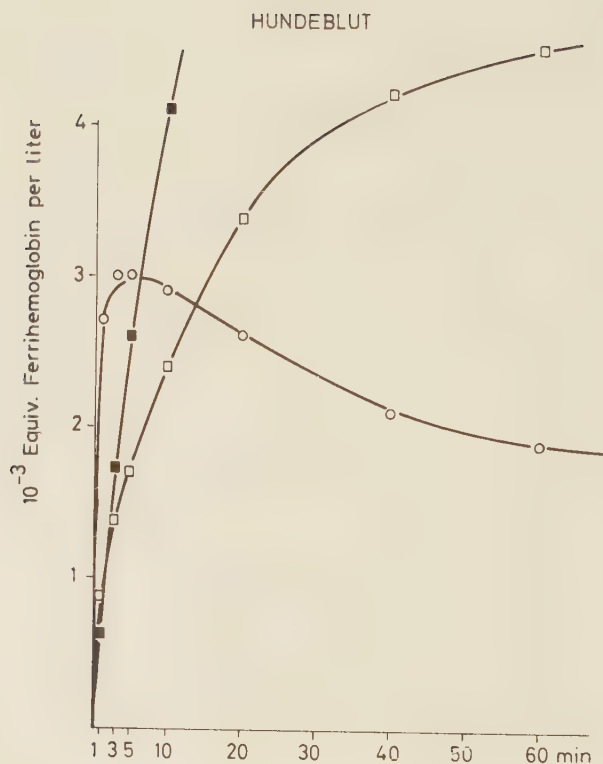


Abb. 6: Bildung von Ferrihämoglobin im Blut vom Hund durch 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol (□), 2-Dimethylamino-phenol (■) und 4-Dimethylamino-phenol (○) in vitro.

Konzentration $4 \times 10^{-4} M$; Temperatur $37^{\circ}C$;

Die Marken sind Mittel aus je 6 Bestimmungen.

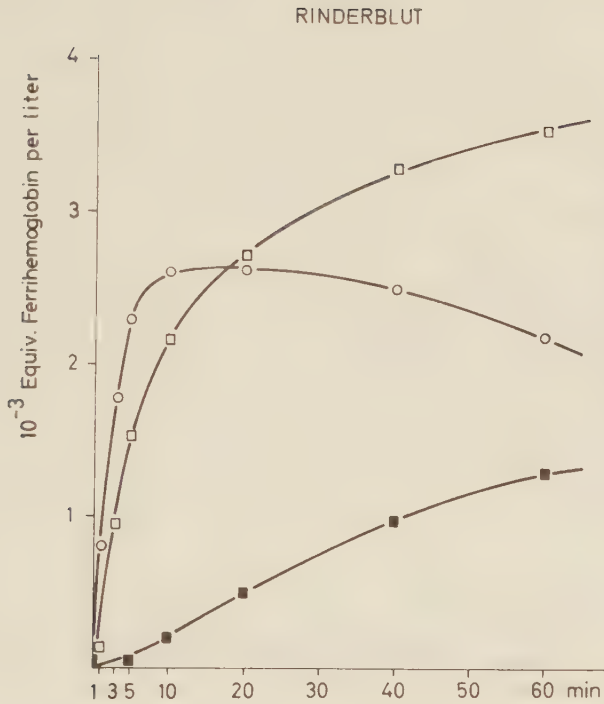


Abb. 7: Bildung von Ferrihämoglobin im Blut vom Rind durch
2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol ($\square$),
2-Dimethylamino-phenol ($\blacksquare$) und 4-Dimethylamino-phenol
(o) in vitro.
Konzentration 4×10^{-4} M; Temperatur 37°C ;
Die Marken sind Mittel aus je 6 Bestimmungen.

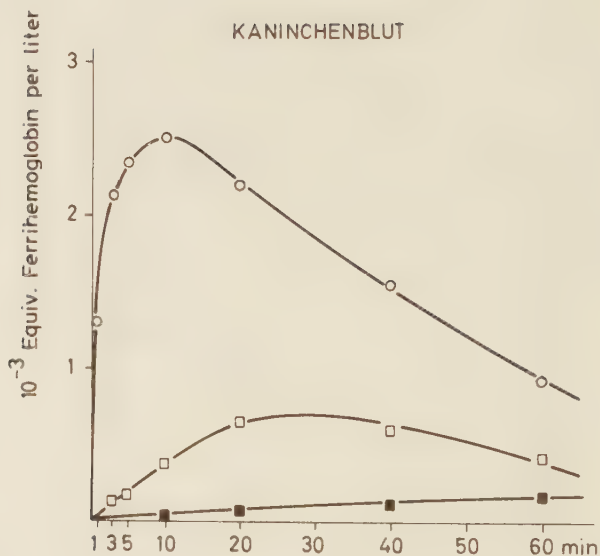


Abb. 8: Bildung von Ferrihämoglobin im Blut vom Kaninchen durch
2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol (□),
2-Dimethylamino-phenol (■) und 4-Dimethylamino-phenol
(o) in vitro.
Konzentration 4×10^{-4} M; Temperatur 37°C ;
Die Marken sind Mittel aus je 6 Bestimmungen.

2. Abnahme von 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol im Blut vom Hund in vitro

Wie Abb. 9 zeigt, erfolgt die Umsetzung von 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol im Blut vom Hund sehr rasch. Nach 20 min war bei einer Konzentration von 400 $\mu\text{g/ml}$ Blut keine Ausgangssubstanz mehr nachzuweisen.

Versuche mit ^{14}C -markierter Substanz zeigten, daß die Substanz eine sehr feste Bindung mit dem Hämoglobin eingeht.

So konnte aus einem Ansatz von $3,5 \times 10^{-3}$ Mol (1,1g) 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol-dihydrochlorid (2-Dimethylamino-phenolanteil ^{14}C -Ring markiert) in 200 ml Erythrozytenkonzentrat - 7,0g Hämoglobin/100 ml - nach 14-stündiger Inkubation nur noch 6,5% der eingesetzten Aktivität mit Äther extrahiert werden. In der wässrigen Phase konnten nochmals 1,2% Aktivität bestimmt werden. 92,3% der Gesamtaktivität waren an das Hämoglobin gebunden.

3. Isolierung der Produkte der Reaktion zwischen 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol und Hämoglobin

$3,5 \times 10^{-3}$ Mol des Dihydrochlorids von 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol wurde zu 200 ml einer Suspension von Hunderythrozyten in isotonem Phosphatpuffer (7,0g Hämoglobin/100 ml) 14 Stunden inkubiert.

Vom tief braun gefärbten Inkubat wurde das denaturierte Hämoglobin abzentrifugiert. Die Lösung wurde mit 10 ml einer 20% Trichloroessigsäurelösung versetzt und die restlichen Proteine ausgefällt.

Mit 1N Natronlauge wurde die enteweißte Lösung auf pH 7,0 gebracht und nach Zugabe von 10g Natriumcarbonat sofort mit einer Lösung von 1,0g 3,5-Dinitrobenzoylchlorid in 250 ml Benzol 30 min lang geschüttelt. Die Benzolphase wurde abgetrennt und zur Entfernung des überschüssigen 3,5-Dinitrobenzoylchlorids 3x mit 10% Natriumcarbonatlösung jeweils 10 min extrahiert (47, 62).

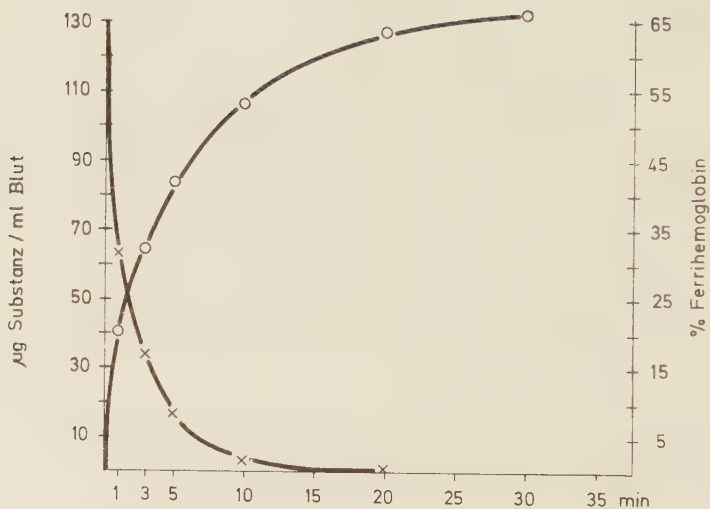


Abb. 9: Abnahme von 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol aus dem Blut vom Hund.

Versuch in vitro bei 37°C;

Konzentration 400 µg Substanz/ml Blut;

x = µg Substanz/ml Blut;

o = % Ferrihämoglobin.

Die Benzollösung wurde eingeengt, auf präparative Kieselgel-Dünnschichtplatten aufgetragen und mit dem Fließmittel Benzol-Äthanol (95+5) chromatographiert (56).

Als Vergleichssubstanz wurden die 3, 5-Dinitrobenzamide von Methylamin, Dimethylamin, Anilin, N-Methylanilin und Ammoniak sowie der 3, 5-Dinitrobenzoyl-ester der Ausgangssubstanz mitchromatographiert.

Die Zonen, deren Rf-Werte mit denen der Vergleichssubstanzen übereinstimmten wurden mit Methanol eluiert.

Aus den Eluaten konnten Substanzen isoliert werden, die mit den 3, 5-Dinitrobenzamid- en von Methylamin, Dimethylamin und N-Methylanilin identisch waren. In geringer Menge konnte auch der 3, 5-Dinitrobenzoyl-ester der Ausgangssubstanz isoliert werden.

Die im folgenden aufgeführten Daten sind für Reaktionsprodukte und authentische Substanzen identisch.

3, 5-Dinitrobenzamide von:

<u>Methylamin:</u>	Rf und Anfärbung mit α -Naphthylamin (52) IR-Spektrum Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt
<u>Dimethylamin:</u>	Rf und Anfärbung mit α -Naphthylamin IR-Spektrum Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt
<u>N-Methylanilin:</u>	Rf und Anfärbung mit α -Naphthylamin IR-Spektrum Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt

3, 5-Dinitrobenzoyl-ester von:

<u>2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol:</u>	UV-Spektrum in Äther Rf und Anfärbung mit α -Naphthylamin IR-Spektrum Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt
---	--

Zur Isolierung von Formaldehyd (9) wurde $3,5 \times 10^{-3}$ Mol 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol-dihydrochlorid zu 200 ml einer Suspension von Hundeerythrozyten in isotonem Phosphatpuffer (7,0 g Hämoglobin/100 ml) gegeben und 16 Stunden bei 37°C inkubiert und zentrifugiert. Die vollständige Enteiweißung erfolgte durch Zugabe von Trichloressigsäure.

Die Lösung wurde auf pH 7,4 gebracht und der pH durch Zugabe von 20 ml 0,7 molarem Phosphatpuffer fixiert. Nach Zugabe von 1,0 g Dimedon in 100 ml Wasser wurde bei 37°C 30 min geschüttelt und danach 2mal mit demselben Volumen n-Hexan ausgeschüttelt. Der Hexanextrakt wurde eingengt, auf präparative Kieselgel-Dünnschichtplatten aufgetragen und mit dem Fließmittel Chloroform-Methanol (90+10) chromatographiert. Die Zone mit dem R_f -Wert für das authentische Formaldemedon wurde mit Methanol eluiert. Durch Einengen des Methanols wurde eine Substanz erhalten, die nach Umkristallisieren aus Chloroform mit Formaldemedon identisch war.

Die Identifizierung erfolgte durch Chromatographie, IR-Spektrum, Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt im Vergleich mit der authentischen Substanz.

III. Wirkungen von 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol in vivo

1. Bestimmung der Toxizität

Um die Toxizität von DMPAP zu ermitteln, wurde zunächst die LD_{50} an Mäusen bestimmt. Dazu wurden Gruppen von je 10 Mäusen 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol in die Schwanzvene injiziert (0,25% Lösung des Hydrochlorids in aqua dest.). Die LD_{50} wurde mit Hilfe des logarithmischen Wahrscheinlichkeitsnetzes ermittelt.

Die Versuche ergaben eine LD_{40} mit 35,0 mg/kg Maus, eine LD_{80} mit 37,5 mg/kg und eine LD_{90} mit 40,0 mg/kg Maus. Aus diesen Werten ergaben sich als LD_{50} 36 mg des Hydrochlorids von DMPAP pro kg Maus, bezogen auf die freie Base sind dies 27,7 mg/kg Maus.

2. Ferrihämoglobinbildung in vivo

a) Dosis-Wirkungskurve

Zur Ermittlung der Dosis-Wirkungskurve wurden je 3 Beagle-Hunden 5, 10, 15 und 20 mg, einem Tier 30 mg DMPAP/kg Körpergewicht intravenös verabreicht. Zur Injektion wurde die Substanz jeweils in 5 ml 0,2N Salzsäure gelöst. Das Tier, welchem 30 mg/kg verabreicht wurden, starb 24 Stunden nach Injektion an Anämie. Jeweils 3, 5, 10, 20, 40, 60 und 120 min nach der Injektion wurden 1-2 ml Blut aus der Beinvene zur Ferrihämoglobinbestimmung entnommen. Abb. 10 zeigt den Verlauf der Dosis-Wirkungskurve bezogen auf maximale Ferrihämoglobinbildung.

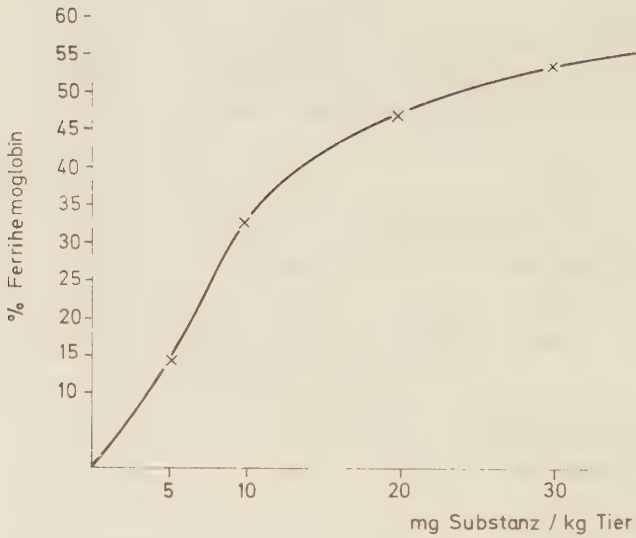


Abb. 10: Dosis-Wirkungskurve von 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol am Beagle-Hund.
Die Marken sind Mittel aus je 3 Versuchen.

b) Kinetik der Ferrihämoglobinbildung in vivo

Die Abb. 11 zeigt die Bildung von Ferrihämoglobin nach intravenöser Injektion von 20 mg DMPAP/kg Körpergewicht am Hund. Nach 3 min hatten sich bereits 29%, nach 10 min 37,1% und nach 40 min 43,1% Ferrihämoglobin gebildet, danach nahm die Ferrihämoglobinkonzentration wieder ab und erreichte nach 4 Stunden Werte zwischen 2 und 4%. 10 mg DMPAP/kg Tier konnten maximal 32,6% Ferrihämoglobin bilden. Demgegenüber bilden 4,2 mg 4-Dimethylaminophenol pro kg im Hund 50% Ferrihämoglobin, davon 30% bereits nach 1 min (40).

Die Abb. 11 zeigt auch die rasche Abnahme von DMPAP im Blut vom Hund nach Injektion von 20 mg 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenyl-amino)-phenol in Abhängigkeit von der Zeit. Die Bestimmung von DMPAP erfolgte jeweils in Proben von 10 ml venösem Blut nach der unter E. 2. beschriebenen Methode. 3 min nach Injektion waren noch 15,5 μ g, nach 15 min 2,5 μ g DMPAP pro ml Blut nachzuweisen. Nach 20 min konnte DMPAP im Blut nicht mehr bestimmt werden.

3. Veränderungen im Blutbild

4 Stunden nach Injektion traten an einzelnen roten Blutkörperchen Zellschädigungen, HEINZ-Körper und Hämolyse auf. Daraus entwickelte sich eine Anämie.

2 Tage nach Gabe der Substanz war das Gesamthämoglobin auf 70% seines Ausgangswertes zurückgegangen und erreichte am 4. Tag seinen niedrigsten Stand, nämlich 40% des Ausgangswertes. Das Maximum der Bildung von HEINZ-Körper war nach 2 Tagen erreicht. Die Zahl der geschädigten Zellen betrug ca. 40% und nahm dann langsam wieder ab. Erst am 17. Tag waren keine HEINZ-Körper mehr nachzuweisen.

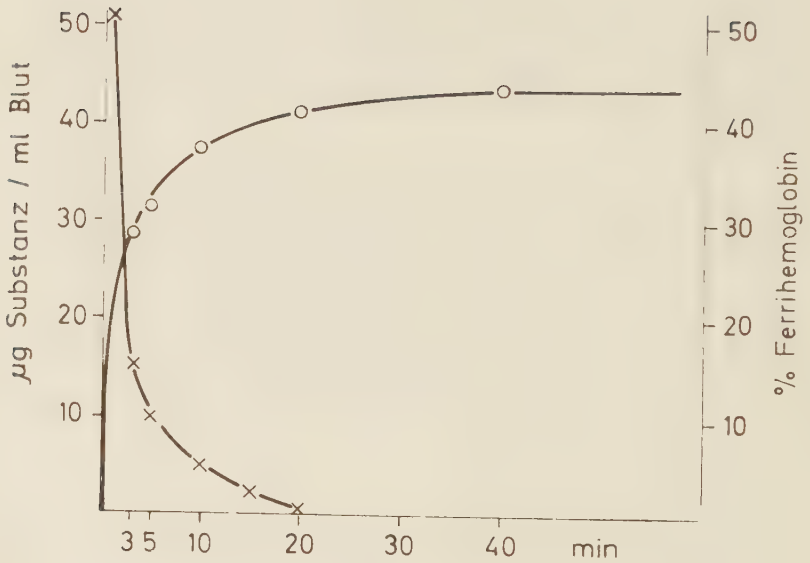


Abb. 11: Bildung von Ferrihämoglobin (o) und Abnahme von DMPAP (x) im Blut vom Hund nach intravenöser Injektion von 20 mg 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol pro kg Körpergewicht.
Die Marken sind Mittel aus je 3 Bestimmungen.

Am 2. bis 3. Tag traten vermehrt Retikulozyten auf, welche auf Regenerationsvorgänge des geschädigten Blutes hindeuten. Am 7. Tag betrug die Zahl der Retikulozyten etwa 20% der roten Zellen.

Die Anämie war am 4. Tag überwunden, der Gesamtblutfarbstoff stieg bis zum 17. Tag nach Injektion wieder an und erreichte an diesem Tag wieder seinen Ausgangswert.

Die Untersuchungen ergaben, daß 2-Dimethylamino-4-(methylphenylamino)-phenol eine die Blutzellen schädigende Verbindung ist und deshalb für eine Therapie der Blausäurevergiftung nicht angewendet werden kann.

WEGER (65) beobachtete bei der Anwendung von 4-Dimethylamino-phenol keine Bildung von HEINZ-Körpern.

4. Weitere Wirkungen

Nach intravenöser Injektion von 15 mg DMPAP pro kg Körpergewicht treten beim Hund nach 15 min Tachykardie, Hyperventilation, erschwerte Respiration und vermehrte Salivation auf. 40 min nach der Injektion waren Herzfrequenz und Atmung wieder normal, die Zunge livide. Die Tiere machten während des Versuches einen apatischen Eindruck, die Schmerzreaktion war vorhanden, ein zentraler Schaden nicht festzustellen. Der nach Versuchsende spontan gelassene Harn war olivgrün gefärbt.

5. Mikroskopische Untersuchung der Organe

Die Organe des 24 Stunden nach Injektion von 30 mg 2-Dimethylamino-4-(methylphenylamino)-phenol pro kg verstorbenen Hundes wurden histologisch untersucht. Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere und Nebenniere wurden nach Einbettung in Paraffinum durum geschnitten und mit Hämatoxilin-Eosin angefärbt. Außerdem wurden Präparate im Gefrierverfahren geschnitten und mit Scharlachrot gefärbt.

Am Herzen wurden herdförmige Muskelnekrosen festgestellt. An einer Stelle waren nekrotische Muskelzellen bläulich verfärbt. Die Nekrosen waren von einer mäßigen zelligen Infiltration begleitet. Im Bereich dieser nekrotischen Muskelzellen waren Histiozyten, Fibrozyten, Leukozyten, Plasmazellen, Lymphozyten und eosinophile Granulozyten zu sehen.

An der Lunge waren keine pathologischen Veränderungen festzustellen. Die Leber zeigte hyperämische Kapillaren, vor allem verstärkt zu den Zentralvenen hin. Die Periportalfelder waren unauffällig. Bei der Fettfärbung zeigten die Epithelien der Gallenwege feine rote Einlagerungen.

Die Milz war ohne pathologischen Befund.

An der Niere waren die Glomeruli nicht wesentlich verändert.

Die Tubuli waren mit Erythrozyten gehäuft bzw. mit roten Kristallen (wahrscheinlich Hämoglobin) gefüllt. In manchen Tubuli war auch Hyalin zu finden. Die Epithelien der Tubuli waren vermehrt nekrotisch und abgeschilfert. Die Nekrosen betrafen vor allem Tubuli im Bereich der inneren Rindenzone. Auch HENlesche Schleifen und Sammelkanälchen waren zum Teil mit Erythrozyten gefüllt.

Zudem war auch die Harnblase prall mit Blut gefüllt.

Hämaturie mit parallel dazu verlaufender Anämie dürfte als Todesursache in Frage kommen.

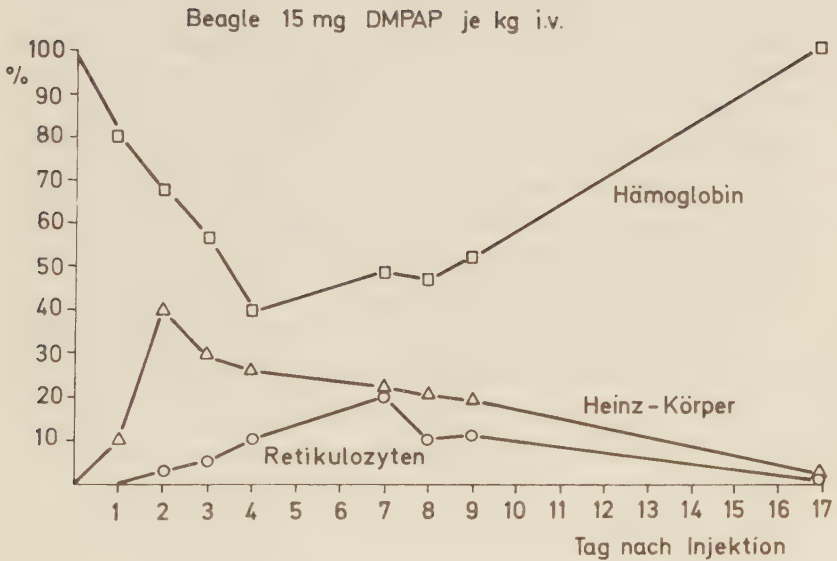


Abb. 12: Blutbild eines Beagle nach intravenöser Injektion von 15 mg 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol pro kg Körpergewicht.

□ Hämoglobin (% des Ausgangswertes)

△ HEINZsche Körperchen (% roter Zellen)

○ Retikulozyten (% roter Zellen)

IV. Untersuchungen der Biotransformation von 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol

Zur Untersuchung der Biotransformation und zur Isolierung von Metaboliten aus dem Harn, wurde ^{14}C -markiertes 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol synthetisiert. Als Ausgangsprodukte dienten N-Methylanilin und 2-Dimethylamino-phenol, deren Ringe mit ^{14}C markiert waren. Es wurde sowohl an beiden Ringen markiertes, als auch nur am 2-Dimethylamino-phenol Ring ^{14}C -markiertes DMPAP hergestellt. 2 Beagle-Hunden wurden je 15 mg des an beiden Ringen markierten DMPAP pro kg Körpergewicht intravenös verabreicht. Die Radioaktivität betrug $9,29 \times 10^5$ dpm/mg Substanz. Um größere Mengen der Stoffwechselprodukte von DMPAP isolieren zu können wurden mehreren Hunden 15mg nicht markierter Substanz pro kg i. v. injiziert. Die Tiere wurden nach der Injektion in Stoffwechselkäfige gebracht und ihr Harn 48 Stunden aufgefangen. Der Harn der Tiere, denen die markierte Substanz verabreicht wurde, wurde 9 Tage, jeweils in täglichen Portionen gesammelt; ebenso wurden die Faeces dieser Hunde über einen Zeitraum von 9 Tagen gesammelt.

1. Verteilung der Radioaktivität im Blut, Harn und in den Organen

Zur Aufstellung einer Ausscheidungskurve bezogen auf die Aktivität des Harnes und einer Eliminationskurve der Aktivität aus dem Blut, wurde in Abständen von 24 Stunden die Radioaktivität im Harn und Blut gemessen. Die Ausscheidung von 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol bzw. seiner Metabolite im Harn verlief relativ langsam. So waren nach dem ersten Tag erst 28,6% bei Hund Nr. 24 und 35% der verabreichten Dosis bei Hund Nr. 11 mit dem Harn eliminiert. Nach 7 Tagen betrug der Wert bei Hund Nr. 24 50,3% und bei Hund Nr. 11 59,4% (siehe Abb. 13).

Die Abnahme der Aktivitäten im Blut stimmte bei beiden Tieren nahezu überein. Nach 1 min waren noch etwa 50%, nach einem Tag 18% und nach 7 Tagen 2% der verabreichten Aktivität im Blut vorhanden. Der Anteil der Radioaktivität der über 9 Tage gesammelten Faeces betrug bei Hund Nr. 24 18,6%, bei Hund Nr. 11 14,6% der eingesetzten Dosis.

Zur Bestimmung der restlichen Aktivität in den Organen wurden die Tiere getötet und die Aktivität in Milz, Leber, Gehirn, Muskel, Niere und Gallenblase bestimmt (Abb. 14).

Die Organe wurden gewogen und ein adäquater Teil in 25 ml Wasser homogenisiert. Jeweils 0,1 ml des Homogenisats wurden zur Messung entnommen. Die Untersuchungen ergaben, daß in Leber, Milz, Niere und Gallenblase noch 2% der eingesetzten Aktivität enthalten waren. Gehirn und Muskel enthielten keine Aktivität. Insgesamt wurden ca. 75% der Ausgangsaktivität erfaßt.

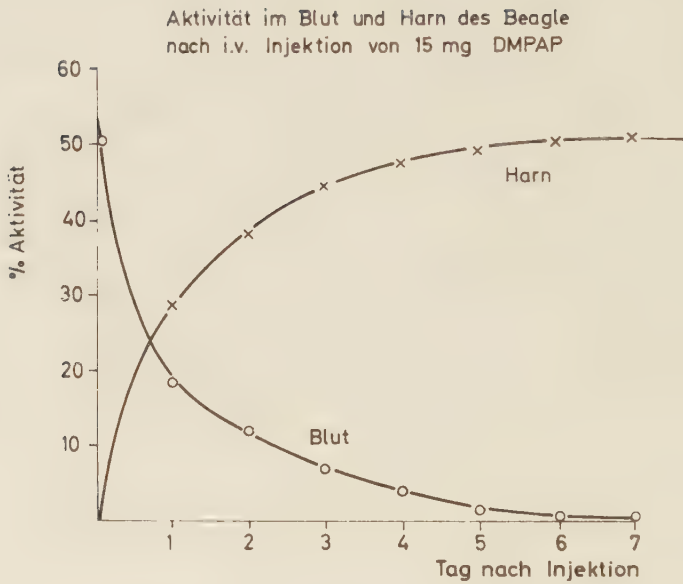


Abb. 13: Bestimmung der Aktivität im Blut (o) und Harn (x) des Hundes nach intravenöser Injektion von 15 mg 2-Dimethyl-amino-4-(methyl-phenylamino)-phenol ^{14}C markiert.

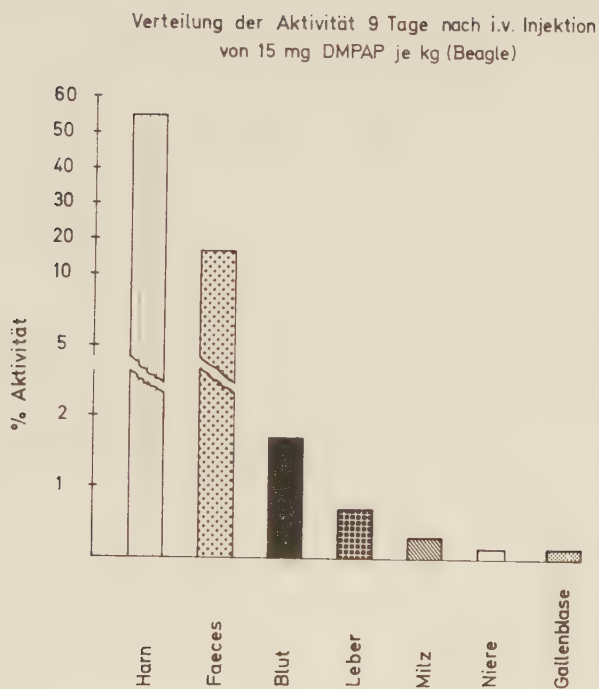


Abb. 14: Verteilung der Radioaktivität 9 Tage nach intravenöser Injektion von 15 mg 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenyl-amino)-phenol - ^{14}C markiert - pro kg Hund.

2. Isolierung von Reaktionsprodukten aus dem Harn

Der 48 Stunden nach Injektion von 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol aufgefangene Harn wurde auf pH 6,8 eingestellt, mit Phosphatpuffer pH 6,8 versetzt und 4mal mit Äther extrahiert. Die Ätherextrakte - "Vollextrakte" - wurden über Na_2SO_4 getrocknet, eingeengt, auf präparative Dünnschichtplatten aufgetragen und mit dem Fließmittel Hexan-Propanol (100+5) zweimal entwickelt.

Ganz entsprechend wurde mit Harn, der vor der Injektion aufgefangen wurde - Leerharn - verfahren.

Vergleiche der Dünnschichtchromatogramme von Leerharnextrakten mit denen von "Vollextrakten" erlaubten die bei letzteren zusätzlich auftretenden Zonen als ungebundene Stoffwechselprodukte von 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol zu deuten. Durch Mitchromatographieren von Substanzen, die als Stoffwechselprodukte des 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol wahrscheinlich waren, wurde das Auftreten von freiem N-Methylanilin festgestellt. Die Identifizierung von N-Methylanilin mit der entsprechenden authentischen Verbindung gründete sich auf übereinstimmende Rf-Werte in verschiedenen Fließmitteln, Anfärbereaktion mit Echtblausalz, UV-Spektrum in ätherischer und salzsaurer Lösung, IR-Spektrum und Schmelzpunkt sowie Mischschmelzpunkt des N-Methylanilin-hydrochlorids. Zudem wurde die Aktivität der entsprechenden Zone im radioaktiven Harnextrakt nachgewiesen.

Nach den Extraktionen mit Äther wurde der Harn mit Glucuronidase (GRD) und Arylsulfatase (ARS) unter N_2 bei 37°C sowohl bei pH 6,8 als auch bei pH 5,0 über mehrere Tage inkubiert. Jeweils nach 12 Stunden Inkubationsdauer wurde 4mal mit Äther extrahiert. In den Ätherextrakten konnte jedoch nur minimale Aktivität gemessen werden, welche dem N-Methylanilin zukam. Die noch zum größten Teil im Harn verbliebene Aktivität mußte einem stark hydrophilen, weder durch GRD noch ARS spaltbarem Stoffwechselprodukt des DMPAP zukommen.

a) Isolierung von Aminen

Die Isolierung flüchtiger Amine, welche durch die oben beschriebene Methode nicht erfaßt werden, erfolgte durch die Bildung der entsprechenden 3,5-Dinitrobenzamide. Die Isolierung wurde mit aktivem und nicht aktivem Harn durchgeführt. Parallel dazu wurde mit Leerharn nach derselben Methode verfahren.

800 ml Harn wurden mit 200 ml wässriger 40% Kaliumcarbonatlösung versetzt und 30 min mit einer Lösung von 1,0 g 3,5-Dinitrobenzoylchlorid in 1000 ml Benzol bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde die Benzolschicht abgetrennt und restliches 3,5-Dinitrobenzoylchlorid durch 3malige Extraktion mit 10%iger Natriumcarbonatlösung dem Benzol entzogen. Nach Abdampfen des Benzols wurde der Rückstand in wenig Aceton aufgenommen und auf präparative Kieselgeldünnschichtplatten mit dem Fließmittel Benzol-Äthanol (95+5) chromatographiert. Als Vergleichssubstanz wurden die 3,5-Dinitrobenzamide von Methylamin, Dimethylamin, Anilin und N-Methylanilin mitchromatographiert.

Die Zonen, deren Rf-Werte mit denen der Vergleichssubstanzen übereinstimmten, wurden mit Aceton eluiert. Aus den Eluaten wurden die 3,5-Dinitrobenzamide von Methylamin, Dimethylamin und N-Methylanilin isoliert.

Im Chromatogramm des Leerharnextraktes konnten Zonen mit entsprechenden Rf-Wert für die Vergleichssubstanzen nicht entdeckt werden. Das Chromatogramm des radioaktiven Harnextraktes zeigte eine aktive Zone von gleichem Rf-Wert für das authentische N-Methylanilin-benzamid. Die Identifizierung der isolierten Substanzen erfolgte im Vergleich mit den synthetisierten authentischen Substanzen durch Rf-Werte, Anfärberreaktion, IR-Spektren, sowie Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt.

b) Isolierung der nicht mit Äther extrahierbaren Stoffwechselprodukte

Da außer Methylamin, Dimethylamin und N-Methylanilin kein weiterer "Metabolit" isoliert werden konnte und die noch im Harn zum größten

Teil verbliebene Aktivität nicht mit Äther oder anderen lipophilen Lösungsmitteln extrahierbar war, mußte zur Isolierung dieser Aktivität anders verfahren werden.

Aufgrund der Isolierung von N-Methylanilin als Stoffwechselprodukt konnte nun auf eine Markierung dieses Bestandteils von 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol verzichtet werden. Die jetzt nach Injektion dieser Verbindung im Harn auftretende Radioaktivität mußte folglich vom 2-Dimethylamino-phenol-anteil der Leukoverbindung stammen, zumindest aber von einem Stoffwechselprodukt, welches den markierten Kohlenstoff des 2-Dimethylamino-phenol-bestandteiles besitzen muß. Es war somit die Voraussetzung für die gezielte Suche des noch fehlenden Stoffwechselproduktes gegeben.

Extraktionsversuche mit dem nun aufgefangenen Harn bestätigten die Nichtextrahierbarkeit der Aktivität aus dem wässrigen Medium bei verschiedenem pH mit lipophilen Lösungsmitteln. Eine neuerliche Inkubation mit GRD und ARS bei pH 6, 8 und pH 5, 0 führte ebenfalls zu keiner Spaltung eines eventuell vorliegenden Konjugats, oder auch dieses war nach Spaltung nicht extrahierbar.

Der Harn wurde daher lyophilisiert und der getrocknete Rückstand versuchsweise mit verschiedenen Lösungsmitteln behandelt. Eine 3malige 12-stündige Extraktion mit Methanol erwies sich als günstig. 90% der gesamten Harnaktivität war im Methanolextrakt enthalten. Nach Einengen des Methanols auf ein kleines Volumen befanden sich jedoch noch zu viele Harnbestandteile im Extrakt, so daß eine chromatographische Trennung in einzelne Zonen noch nicht möglich war. Der Extrakt wurde zur Trockne gebracht, in wenig Wasser aufgenommen, die Lösung kochsalzgesättigt und 3mal mit der 10-fachen Menge Chloroform extrahiert. 73% der Aktivität ließen sich mit Chloroform ausschütteln. Durch diesen zweimaligen Reinigungsschritt konnte der eingeengte Chloroformextrakt direkt im System Äthylacetat-Methanol-Wasser (100+16,5+13,5) präparativ auf Kieselgelplatten chromatographiert werden.

Bei Rf 0,3 konnte eine aktive, gut von anderen Harnbestandteilen abgetrennte Zone bestimmt werden, welche sich nach Besprühen mit wässriger Echtblausalzlösung dunkelrot bis braun verfärbte. Nach Eluieren dieser Zone mit Aceton konnten UV-Spektren in Methanol, 1N salzsaure Lösung und in 1N Natronlauge geschrieben werden.

Vergleiche dieser Spektren mit den entsprechenden Spektren der Leukoverbindung zeigten eine annähernde Übereinstimmung in Methanol. Sie hatten ein gemeinsames Absorptionsmaximum bei 242 nm, während das zweite Absorptionsmaximum bei 283,5 nm im Spektrum der Leukoverbindung nach 290 nm im Spektrum des Stoffwechselproduktes verschoben war. Die Spektren in salzsaure Lösung und in Natronlauge waren verschieden.

Nachdem nun ein befriedigendes Verfahren zur Isolierung dieses Metaboliten gefunden war, wurde der gesamte restliche Harn der Tiere, welche mit nicht markierter Substanz injiziert waren, nach dieser Methode aufgearbeitet. Es konnten so ca. 50-60 mg dieser Substanz rein isoliert werden. (Umkristallisation aus Methanol/Äther).

c. Untersuchungen zur Aufklärung der Struktur des isolierten wasserlöslichen Stoffwechselproduktes

Die isolierte Substanz war wasserlöslich, sie löste sich gut in Methanol und Aceton, mäßig in Chloroform. In Äther war sie unlöslich. Die gute Löslichkeit in verdünnten Säuren und Basen deutete sowohl auf saure als auch basische Gruppen im Molekül hin. Aus Natronlauge konnte die Substanz im Gegensatz zur Leukoverbindung, wieder vollständig zurückgewonnen werden. Die Substanz war sehr stabil, sie bildete mit Kaliumdichromat und anderen Oxidationsmitteln keinen Farbstoff. Sie besaß einen Schmelzpunkt von 215-217°C ohne Zersetzung.

NMR-Spektrum: Das Spektrum unterscheidet sich im wesentlichen nicht vom Spektrum der Leukoverbindung. Es zeigte 8 aromatische Protonen, eine Methylamino- und eine Dimethylaminogruppe. Eine OH-Gruppe konnte jedoch nicht sicher gedeutet werden. Ein Austausch mit Deuterium erbrachte keine Veränderung des Spektrums.

IR-Spektrum: Das IR-Spektrum zeigte im Gegensatz zum Spektrum der Leukoverbindung eine deutlich ausgeprägte Bande bei $1050-1060\text{ cm}^{-1}$. Diese Bande konnte mit großer Sicherheit einer S=O Gruppe zugeordnet werden. Das IR-Spektrum des Phenolphthaleinsulfats erbrachte dieselbe ausgeprägte Bande bei $1050-1060\text{ cm}^{-1}$, welche im Spektrum der Phenolphthaleinbase fehlte.



IR-Spektrum von 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-schwefelsäurephenylester-natriumsalz in KBr.

Massenspektrum: Massenspektrometrische Untersuchungen ergaben für das Stoffwechselprodukt das Molekulargewicht 242 und damit dasselbe Molekulargewicht wie für die Leukoverbindung. Ein zusätzlich auftretendes Signal bei 64 deutete auf ein SO_2 -Bruchstück hin.

Durch halbstündiges Kochen eines Teiles der Substanz in 10%iger Salzsäure am Rückfluß konnte aus der purpur verfärbten Lösung nach Reduktion mit Ascorbinsäure eindeutig die Leukoverbindung bestimmt werden (durch UV-Spektren in Äther, 1N Salzsäure, 1N Natronlauge, sowie Spektrum des Farbstoffs im Sichtbaren).

Die Prüfung auf Sulfat mit Bariumchlorid im wässrigen salzsauren Rückstand verlief positiv - weißer kristalliner Niederschlag.

Die Elementaranalyse erbrachte ebenfalls einen Schwefelanteil des Moleküls. Flammenphotometrisch konnte Natrium bestimmt werden.

All diese Untersuchungen deuten auf das Natriumsalz des Schwefelsäurephenylesters XVI der Leukoverbindung hin (siehe Abb. 15).

Diese Vermutung wurde noch erhärtet durch die Synthese dieser Verbindung aus 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol mit Chlorsulfonsäure in Pyridin. Sie zeigte Übereinstimmung hinsichtlich des Schmelzpunktes, Mischschmelzpunktes, des UV-Spektrums in Methanol, 1N HCl und 1N Natronlauge sowie hinsichtlich des IR-Spektrums.

C. DISKUSSION

2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol (DMPAP) ist die Leukoverbindung des purpurnen Farbstoffs, der durch oxidative Kondensation aus den primär gebildeten Reaktionsprodukten N-Methylanilin und 2-Dimethylamino-phenol in Inkubaten von Dimethylanilinoxid und Ferrihämoglobin oder Ferricytochrom c sekundär entsteht.

Die Oxidation der Leukoverbindung mit Dichromat ergab, daß zur Bildung des Farbstoffes der Entzug von 2 Elektronen erforderlich ist. ESR-Messungen erbrachten keinen Hinweis auf das Auftreten von Radikalen.

Nach Zugabe von DMPAP zu Hundeblut wurde daraus sowohl Dimethylamin als auch N-Methylanilin isoliert. Da diese durch Hydrolyse des entsprechenden o- bzw. p-Chinoniminderivates der Leukoverbindung entstehen, ist anzunehmen, daß der purpurne Farbstoff in zwei Formen auftritt, als o- und p-Chinonimin. Diese beiden Formen sind möglicherweise die mesomeren Grenzstrukturen des Farbstoffs.

Der purpurne Farbstoff spielt neben 2- und 4-Dimethylamino-phenol eine wichtige Rolle bei der Ferrihämoglobinbildung durch Dimethylanilinoxid. Aufgrund dieser raschen Ferrihämoglobinbildung durch den Farbstoff von DMPAP wurde diese mit der Ferrihämoglobinbildung durch 2-Dimethylamino-phenol, einer Komponente der Leukoverbindung und mit der Ferrihämoglobinbildung durch 4-Dimethylamino-phenol, der zur Zeit geeignetsten Substanz in der Blausäuretherapie, verglichen.

Seit KOBERT (36) und SZIGETI (57) die Reaktion zwischen Cyanidionen und Ferrihämoglobin entdeckten und die Untersuchungen von ALBAUM, TEPFERMANN und BODANSKY 1946 (2), DELGA 1952 (3), SCHUBERT und BRILL 1968 (53) gezeigt haben, daß diese Reaktion die durch Cyanidionen gehemmte Cytochromoxidase reaktivieren kann, hat es nicht an Versuchen gefehlt, ferrihämoglobinbildende Substanzen auf ihre therapeutische Verwendbarkeit bei der Vergiftung durch Blausäure zu untersuchen.

Untersuchungen der Kinetik verschiedener Ferrihämoglobinbildner durch KIESE und MENZEL (25), KIESE und PEKIS (26) sowie KIESE und RACHOR (27) und KIESE, RAUSCHER und WEGER (31) ergaben, daß einige Aminophenole, besonders das 4-Dimethylamino-phenol (28, 29, 30, 34, 40, 63, 64) beim Menschen sehr viel schneller eine begrenzte, dosisabhängige Ferrihämoglobinkonzentration bilden, als das von HUG (22) eingeführte Natriumnitrit.

Für die Behandlung der experimentellen Blausäurevergiftung durch Ferrihämoglobinbildner spielt deren Reaktionsgeschwindigkeit eine große Rolle. So ist eine schnelle Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion HbFe^{2+} zu HbFe^{3+} notwendig und eine Blutkonzentration von 30-40% Ferrihämoglobin erwünscht (40).

2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol wirkt in Dosen, welche 30-40% Hämoglobin oxidieren, toxisch. 15 mg DMPAP je kg, die im Hund ca. 40% Ferrihämoglobin bilden, bewirken Hämolyse und Abnahme des Gesamthämoglobin um 60% innerhalb von 4 Tagen. Die Bildung von HEINZ¹ Körperchen erreicht nach 2 Tagen mit 40% der roten Zellen einen sehr hohen Wert.

Der Harn von Hunden, denen 20 mg DMPAP je kg verabreicht wurden, enthielt Blut. Histologische Untersuchungen zeigten Schäden an den Nierentubuli. Eine Dosis von 30 mg DMPAP je kg tötete ein Tier 24 Stunden nach der Injektion.

Da die LD_{50} für Mäuse 27,7 mg/kg beträgt und 10-15 mg DMPAP zur Bildung von 30-40% Ferrihämoglobin erforderlich sind, kann DMPAP aufgrund seiner Toxizität für die Therapie der Cyanidvergiftung keine Anwendung finden. WEGER (65) stellte nach i. v. -Gabe therapeutischer Dosen von 4-Dimethylamino-phenol über 14 Tage keine schädigende Wirkung fest. Möglicherweise ist die Phenylendiamin-Struktur der Leukoverbindung Grund für die Toxizität dieser Substanz.

DUBOIS und VIGNON 1888 (4, 5) machten die ersten Mitteilungen über toxische Wirkungen von p-Phenylendiaminen. Sie beobachteten nach Verabreichung von 0,1 g pro kg Körpergewicht an Hunden ein unter Salivation, Tenesmen und starker Atemnot tödlich verlaufendes Vergiftungsbild.

Allergische Reaktionen durch p-Phenylendiamin wurden von ERDMANN und VAHLEN 1905 (6) und von MAYER 1958 (42), entsprechende Reaktionen durch N-alkylierte oder N-acetylierte Phenylendiamine von HANZLIK 1923 (16) berichtet.

Untersuchungen von STAHL und JUNG 1953 (55) zeigten, daß m-Phenylendiamine toxisch auf das Blut wirken. Sie entdeckten, daß m-Toluylendiamin und m-Phenylendiamin im Blut verschiedener Spezies Ferrihämoglobinbildung, Hämolyse und Denaturierung des Hämoglobins bewirken.

Erste Angaben über Ferrihämoglobinbildung durch Phenylendiamine machten AFANASSIEW (1) und STADELMANN (54). MATSUMOTO (41) wies die Bildung von Ferrihämoglobin durch o-, m- und p-Phenylendiamin in vitro nach. JUNG (23) beobachtete Ferrihämoglobinbildung an Katzen durch m-Phenylendiamin.

KIESE und SEIPELT (24) berichteten, daß hohe Dosen von p-Phenylendiamin im Hund eine geringe, m-Toluylendiamin dagegen eine stärkere Ferrihämoglobinbildung bewirken. Die Kinetik der Ferrihämoglobinbildung durch p-Phenylendiamin an Hunden wurde von KIESE und Mitarbeiter (33) untersucht.

Der Mechanismus der Ferrihämoglobinbildung durch DMPAP erklärt sich folgendermaßen:

DMPAP überträgt Elektronen auf molekularen Sauerstoff. Die dadurch gebildeten Chinonimine übernehmen Elektronen vom Eisen des Ferrohämoglobins und werden zu DMPAP zurückgebildet. Diese beiden Reaktionen wiederholen sich. Ein Molekül DMPAP kann daher eine

Vielzahl von Äquivalenten Ferrohämoglobin oxidieren. DMPAP ist somit ein Katalysator für die Transferierung von Elektronen vom Ferrohämoglobin auf molekularen Sauerstoff. Der Kreisprozess der Ferrihämoglobinbildung nimmt in dem Maße ab, in dem die Konzentration von DMPAP durch Sulfatbildung und durch Hydrolyse der Chinonimine abnimmt.

D. ZUSAMMENFASSUNG

Der purpurne Farbstoff, welcher in Inkubaten von Dimethylanilin-oxid mit Ferrihämoglobin oder Ferricytochrom c entsteht, und welcher eine wichtige Rolle in der autokatalytischen Ferrihämoglobinbildung durch Dimethylanilinoxid spielt, wurde als Oxidationsprodukt des 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenols (DMPAP) erkannt.

UPAC: 2-Dimethylamino-4-(N-methyl-anilino)-phenol.

Die Struktur von DMPAP wurde durch ESR-, IR-, NMR-spektrometrische und chemische Untersuchungen aufgeklärt und durch Synthese der Verbindung aus N-Methylanilin und 2-Dimethylamino-phenol erhärtet. Das Ergebnis dieser Untersuchungen wurde endgültig durch Röntgenstrukturanalyse bestätigt.

Im Blut verschiedener Species wurde in vitro die Bildung von Ferrihämoglobin durch DMPAP im Vergleich mit 2- und 4-Dimethylamino-phenol gemessen. DMPAP bildet im Blut von Mensch, Rind und Hund mehr Ferrihämoglobin und über einen längeren Zeitraum als 4-Dimethylamino-phenol, jedoch war die Anfangsgeschwindigkeit der Ferrihämoglobinbildung geringer.

In der Ferrihämoglobinbildung in vivo am Hund war DMPAP dem 4-Dimethylamino-phenol unterlegen. DMPAP wirkte im Gegensatz zu 4-Dimethylamino-phenol toxisch auf das Blut, außerdem werden die Nierentubuli des Hundes durch DMPAP geschädigt.

Da auch die therapeutische Breite eindeutig gegen DMPAP spricht (die LD_{50} von DMPAP an Mäusen beträgt 27,7 mg je kg, die von 4-Dimethylamino-phenol beträgt 50 mg je kg), kann DMPAP als Antidot der Cyanidvergiftung keine Anwendung finden.

Die Untersuchungen der Biotransformation von DMPAP erfolgte mit ^{14}C -markierter Substanz. Die Ausscheidung der Stoffwechselprodukte von DMPAP mit dem Harn erfolgt langsam. Methylamin, Dimethylamin, N-Methylanilin und der Schwefelsäurephenylester von DMPAP wurden als Stoffwechselprodukte aus dem Harn von Hunden isoliert und identifiziert. In vitro wurde zusätzlich Formaldehyd als Umsetzungsprodukt von DMPAP im Blut isoliert und identifiziert.

E. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Synthesen bzw. Herkunft der Substanzen

N-Nitroso-3-hydroxy-diphenylamin (37)

0,1 Mol (18,5g) 3-Hydroxy-diphenylamin (Schm. p. : 82°C) werden unter Eiskühlung und Rühren mit einer Lösung von 10g H_2SO_4 in 100 ml Wasser vorsichtig versetzt. Zu der Lösung läßt man eine Lösung von 0,1 Mol (6,9g) NaNO_2 in etwa 1400 ml Wasser langsam unter kräftigem Rühren zutropfen.

Das gebildete Nitrosamin scheidet sich in feinen gelben Nadeln ab. Nach Umkristallisieren aus wässrigem Methanol schmilzt die Verbindung bei 114°C unter Zersetzung.

Ausbeute: 18,4g = 87% d. Th.

4-Nitroso-3-hydroxy-diphenylamin (37)

10g N-Nitroso-3-hydroxy-diphenylamin werden in einem Gemisch aus 20 ml absolutem Methanol und 70 ml Äther gelöst und unter Eiskühlung tropfenweise mit 20 ml einer 12,5% alkoholischen Salzsäure versetzt. Aus der sich dunkelrot färbenden Reaktionsmischung scheidet sich bei -30°C das Hydrochlorid des 4-Nitroso-3-hydroxy-diphenyls in Form bräunlich gefärbter Blättchen ab. Durch Hydrolyse in wässriger Lösung scheidet sich 4-Nitroso-3-hydroxy-diphenylamin ab, das nach Umkristallisieren aus Benzol in roten Nadeln, Schmelzpunkt 145°C , erhalten wird.

Ausbeute: 9,5g = 95% d. Th.

4-Amino-3-hydroxy-diphenylamin (37)

4-Nitroso-3-hydroxy-diphenylamin wird in konzentrierter Salzsäure gelöst und durch Zugabe von Zinn bis zur Entfärbung der Reaktionsmischung reduziert. Die Lösung wird mit H_2O auf eine etwa 1,5N Salzsäurekonzentration verdünnt. Durch Einleiten von H_2S wird die

Lösung entzinnt und vom entstandenen Sn_2S abfiltriert. Durch Einengen der Lösung zur Trockne erhält man das Amin als Hydrochlorid, das sich an der Luft bläulich verfärbt.

Die Base erhält man durch Lösen des Salzes in Wasser, abpuffern auf pH 7 und sofortige Ätherextraktion unter ständigem Einleiten von H_2S . Durch Einengen der Ätherlösung scheiden sich weiße Kristalle ab, die an der Luft sofort oxidiert werden.

Schm. p. : 140°C unter Blaufärbung

Ausbeute: 43% d. Th.

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$ (200, 0)

ber.	C	71, 97	H	6, 04	N	13, 99	O	7, 99
gef.	C	72, 03	H	5, 98	N	13, 64	O	8, 03

4-Fluor-N, N-dimethylanilin (39)

21 ml 4-Fluoranilin werden in einem Autoklaven unter Eiskühlung mit 25 ml Dimethylsulfat versetzt und 2 Stunden bei 200°C und 9 Atmosphären erhitzt. Das Reaktionsgemisch, ein rötlich gefärbtes viskoses Öl, wurde mit Natronlauge alkalisiert und mit Äther extrahiert. Nach Abdampfen des Äthers wurde der Rückstand unter Wasserstrahlvakuum destilliert. Bei 77°C und 11 Torr geht 4-Fluor-N, N-dimethylanilin über.

Nach Umkristallisieren aus wässrigem Methanol schmelzen die farblosen Kristalle bei 35°C .

Ausbeute: 17, 1g = 56% d. Th.

Die Synthese von 4-Fluor-dimethylanilinoxid-hydrochlorid, 2-Dimethylamino-5-fluor-phenylacetat und 2-Dimethylamino-5-fluor-phenol erfolgte entsprechend den Angaben der Chlorderivate nach HUISGEN, BAYER-LEIN, HEYDKAMP (19, 20).

4-Fluor-dimethylanilinoxid-hydrochlorid

45g 4-Fluor-N, N-dimethylanilin werden in 650 ml Methanol gelöst und mit 300 ml 30% Wasserstoffperoxidlösung tropfenweise versetzt und 7 Stunden bei 53°C heftig gerührt. Danach wird noch 12 Stunden bei dieser Temperatur ohne Rühren belassen. Die Zersetzung des überschüssigen H_2O_2 erfolgt durch Platinasbest unter Kühlung und heftigem Rühren. Das Reaktionsgemisch wird nach Filtrieren mit dem fünffachen Volumen Wasser versetzt und 4mal mit Äther extrahiert (Ätherextrakte verwerfen). Nach Ansäuern mit konzentrierter Salzsäure wird im Wasserstrahlvakuum bei einer Badtemperatur von 55°C zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in Methanol gelöst und mit Äther bis zur beginnenden Trübung versetzt. Die Substanz kristallisiert bei -30°C in weißen Kristallen aus.

Schm. p.: 169-171°C

Ausbeute: 40,2g = 64,5% d. Th.

$C_8H_{10}FNO$ (191,5)

ber.	C	50,16	H	5,74	F	9,92	Cl	18,51	N	7,31
gef.	C	50,22	H	5,75	F	9,74	Cl	18,49	N	7,45

2-Dimethylamino-5-fluor-phenylacetat

Zu einer Lösung von 25g Fluor-dimethylanilinoxid-hydrochlorid in 200 ml 0,66 N Sodalösung werden unter Rühren und Eiskühlung innerhalb von 30 min 25 ml Acetanhydrid zutropft, wobei sich das Reaktionsgemisch dunkelrot färbt. Nach 2 Stunden wird das überschüssige Acetanhydrid durch Zugabe einer konzentrierten Sodalösung hydrolysiert. Es wird 4mal mit Äther extrahiert, die vereinigten Ätherextrakte über $CaCl_2$ getrocknet und der Äther abdestilliert. Der Rückstand, ein bräunliches Öl wird im Wasserstrahlvakuum bei 12 Torr 2mal destilliert. Die bei 79-80°C und 12 Torr übergehende Fraktion erstarrt im Kolben. Durch Umkristallisieren auf n-Heptan erhält man die Verbindung rein mit Schmelzpunkt 47,5°C.

2-Dimethylamino-5-fluor-phenol

2-Dimethylamino-5-fluor-phenylacetat wird 15 min in 1N methanolischer KOH unter Rückfluß erhitzt. Danach wird mit verd. Salzsäure angesäuert, das Methanol abgedampft, mit Soda neutralisiert und der Niederschlag 3mal mit Äther extrahiert.

Nach Trocknen über CaCl_2 wird der Äther abdestilliert und der Rückstand aus n-Heptan umkristallisiert.

Schm. p.: 46°C

Ausbeute: 71%

4-Brom-dimethylanilinoxid-hydrochlorid, 2-Dimethylamino-5-brom-phenylacetat, 2-Dimethylamino-5-brom-phenol, Dimethylanilinoxid-hydrochlorid, 2-Dimethylamino-phenylacetat und 2-Dimethylamino-phenol wurden ebenfalls nach der Methode von HUISGEN, BAYERLEIN und HEYDKAMP (19, 20) hergestellt.

N, N, N'- Trimethyl-N'-phenyl-phenylendiamin-(1, 4) (38)

9, 2g (0, 05 Mol) p-Amino-diphenylamin, 40 ml Methanol und 0, 5g o-Phosphorsäure werden im Autoklaven über 26 Stunden bei 230°C Badtemperatur und 44 Atmosphären erhitzt. Die Reaktionsmischung wird mit dem fünffachen Volumen Wasser versetzt und 3mal mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wird eingeeengt und auf präparativen Kieselgeldünnschichtplatten mit dem Fließmittel Hexan-Propanol (100+5) chromatographiert. Die Substanz mit dem R_f -Wert von 0, 8 ist das gewünschte Produkt. Es wird mit Aceton eluiert und aus wässrigem Methanol umkristallisiert.

Schm. p.: 57°C

$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2$ (226, 3)

ber.	C	79, 61	H	8, 01	N	12, 38
gef.	C	79, 64	H	8, 38	N	12, 08

N-Methyl-Natriumanilid (15)

20 Teile N-Methylanilin und 0,02 Teile Kobaltoxid werden zum Sieden erhitzt. Dazu wird in kleinen Stücken metallisches Natrium mit der Maßgabe zugegeben, daß vor jeder weiteren Zugabe das Ende der Reaktion abgewartet wird (Wasserstoffentwicklung). Die Reaktion kommt bei 195°C nach etwa einer halben Stunde in Gang. Das Gemisch färbt sich bräunlich. Nach Abklingen der Reaktion wird das überschüssige N-Methylanilin bei einer Badtemperatur von 135°C im Vakuum abdestilliert (78°C/11 Torr). Zurück bleibt eine dunkelbraune, feste Masse, welche sehr hygroskopisch ist. Metallisches Natrium ist nicht mehr vorhanden.

N-Methylanilin-d₅-deuterochlorid

Zu 2,37 ml (0,03 Mol) Anilin-d₅ in 4 ml Deuteriumoxid werden 1,88 ml (0,03 Mol) Methyljodid unter Eiskühlung zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird auf Zimmertemperatur gebracht und gerührt bis die Lösung homogen ist. Nach Alkalisieren mit 2N Natronlauge wird 3mal mit Äther extrahiert. Die Ätherextrakte werden vereinigt, getrocknet, auf ein kleines Volumen eingeeengt und mit dem Fließmittel Hexan-Propanol (100+5) präparativ auf Kieselgeldünnschichtplatten chromatographiert. Die Substanz mit dem R_f-Wert für N-Methylanilin wird mit absolutem Äther eluiert und die Substanz durch Einleiten von DCl - aus NaCl und D₂SO₄ - als Deuterochlorid ausgefällt. Umkristallisieren aus Äther-Methanol. Die Identifizierung erfolgte im Vergleich mit N-Methylanilinhydrochlorid.

2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol (DMPAP)

685 mg (0,005 Mol) 2-Dimethylamino-phenol und 718 mg (0,005 Mol) N-Methylanilin-hydrochlorid werden in 20 ml 1N Schwefelsäure gelöst und tropfenweise mit 980 mg Kaliumdichromat in 10 ml 1N H₂SO₄ bei Raumtemperatur versetzt. Die Reaktionslösung färbt sich sofort purpur.

Nach Beenden der Reaktion wird noch 15 min gerührt, Eis-gekühlt und tropfenweise mit 0,5N Natronlauge unter guter Eiskühlung auf pH 6,0 gebracht. Danach wird sofort von nicht umgesetzten Produkten ausgeäthert (Ätherextrakte verwerfen). Die so von Äther-löslichen Verunreinigungen befreite Farbstofflösung wird nun durch Zugabe von Ascorbinsäure bis zum Farbumschlag nach grün reduziert und unter Eiskühlung auf pH 5,5 (mit 0,5N NaOH) gebracht. Es scheidet sich dabei die Leukoverbindung des purpurnen Farbstoffs als gelblich-weißer Niederschlag ab. Dieser wird 3mal mit Äther extrahiert, die Ätherextrakte über CaCl_2 getrocknet und der Äther abdestilliert. Der ölige bräunliche Rückstand wird in wenig N_2 -gesättigtem Methanol aufgenommen und mit Stickstoff-gesättigtem Wasser bis zur Trübung versetzt.

Über Nacht bei -30° auskristallisieren lassen. Durch zweimaliges Umkristallisieren erhält man die Verbindung in reinen weißen Kristallnadeln.

Schm. p. : 76°C

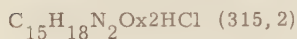
Ausbeute: 775 mg = 64% d. Th.

Für die Oxidation äquivalenter Mengen 2-Dimethylamino-phenol und N-Methylanilin in schwefelsaurer Lösung mit Dichromat waren bis zur maximalen Bildung des purpurnen Farbstoffs 4 Äquivalente Dichromat erforderlich. Das heißt, zwei Äquivalente werden für die Bildung der Leukoverbindung, welche primär entsteht, verbraucht und weitere zwei Äquivalente zur nachfolgenden Oxidation zu dem purpurnen Farbstoff.

Als Reduktionsmittel erwies sich Ascorbinsäure als das Mittel der Wahl. Andere Reduktionsmittel, wie Zinn/HCl, Natriumdithionit oder auch Schwefelwasserstoff hatten nicht so befriedigende Ausbeuten zur Folge.

Durch Lösen der Base in salzsaurem Methanol konnte das Hydrochlorid der Leukoverbindung mit absolutem Äther ausgefällt werden. Es kristallisiert in weißen Kristallen mit Schmelzpunkt von $94-96^\circ\text{C}$.

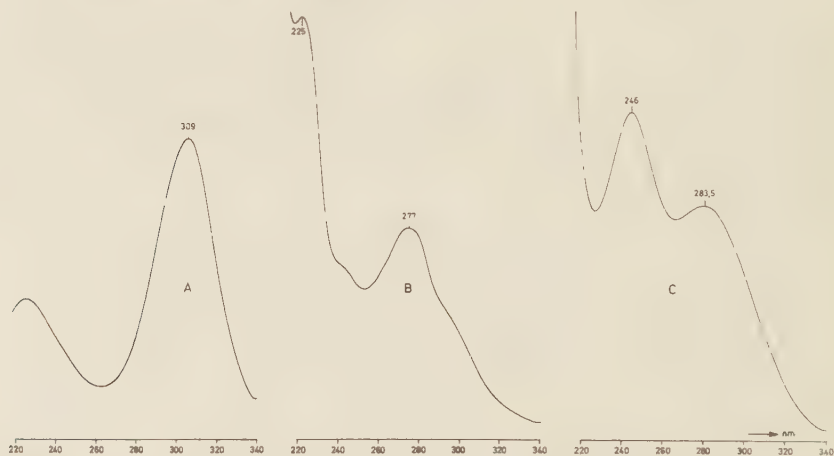
Gravimetrische, maßanalytische sowie elementaranalytische Bestimmung des Chloranteils des Moleküls ergaben als Ergebnis, daß die Substanz ein Dihydrochlorid bildet.



ber. C 57,15 H 6,39 N 8,89 O 5,07 Cl 22,49

gef. C 57,45 H 6,57 N 8,58 O 4,97 Cl 22,43

Das synthetisch hergestellte 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol war mit der isolierten Leukoverbindung des purpurnen Farbstoffs aus Inkubaten von Dimethylanilinoxid und Ferrihämoglobin oder Ferri-cytochrom c in allen angeführten chemischen und physikalisch-chemischen Untersuchungen identisch.



Absorptionsmaxima von DMPAP im UV in 1N Natronlauge (A), 1N Salzsäure (B) und Äther (C).



IR-Spektrum von DMPAP in KBr.

Tabelle 2

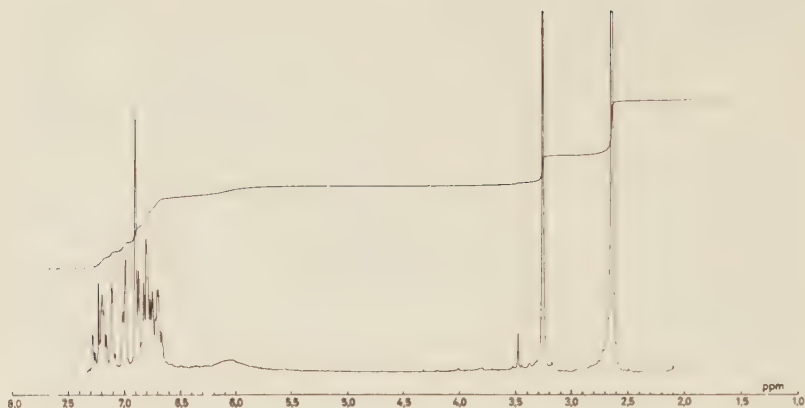
Protonenresonanzen der Leukoverbindung

in Deuteriochloroform	Zuordnung
2, 63 ppm (6H/s)	-N(CH ₃) ₂
3, 24 ppm (3H/s)	>N-CH ₃
6, 04 ppm (1H/s, breit) aus- tauschbar mit D ₂ O	-OH
6, 7-7, 0 ppm (6H/m)	6 aromat. H
7, 1-7, 3 ppm (2H/m)	2 aromat. H

Tabelle 3

Schwingungsbanden der Leukoverbindung im IR

in KBr (cm ⁻¹)	Zuordnung
3365	OH
3040	aromat. C-H
2940; 2850; 2780	C-H von CH ₃
1590; 1565; 1495	aromat. C=C
1330	C-N
1292	C-N (?)
1200	C-O (Phenol)
890; 870; 860; 815	C ₆ H ₃ -(1, 2, 4-trisubst.)-Wagging. Substitutionsgrad konnte nicht eindeutig entnommen werden
740; 686	C ₆ H ₅ -Wagging



NMR-Spektrum von DMPAP in CDCl_3 , TMS int.

Bildung des purpurnen Oxidationsproduktes von DMPAP

DMPAP-dihydrochlorid wird in wenig Wasser gelöst und mit einer äquimolaren Menge Kaliumdichromat versetzt. Die sich purpur färbende Lösung wird mit 0,5N Natronlauge auf pH 6,5 gebracht und 4mal ausgeäthert (Ätherextrakte verwerfen). Nach Sättigen der wässrigen Lösung mit NaCl wird der Farbstoff mit gewaschenem Chloroform extrahiert. Die Chloroformphase wird mit einem kleinen Volumen Wasser (CO_2 -gesättigt) ausgeschüttelt. Der Farbstoff geht dabei vollständig in die wässrige Phase über, diese wird lyophilisiert und die purpurne Substanz im Exsiccator aufbewahrt.

Der purpurne Farbstoff ist stark hygroskopisch und bei Raumtemperatur an der Luft wenig beständig. Aufgrund dieser Eigenschaften war es sehr schwierig Lösungen von bekannter Farbstoffkonzentration herzustellen. Um eine exakte Bestimmung des Farbstoffs in Lösungen zu ermöglichen, wurde der molare Extinktionskoeffizient für den Farbstoff durch Oxidation bekannter Mengen des hergestellten Dihydrochlorids der Leukoverbindung ermittelt.

Die Oxidation erfolgte mit Kaliumdichromat in 20% Essigsäure, in 1N HCl oder in Phosphatpuffer pH 6,5. Gleiche Mengen des Dihydrochlorids ergaben bei den unterschiedlichen Bedingungen im Absorptionsmaximum des Farbstoffs bei 546 nm übereinstimmende Extinktion. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ beträgt:

$$\epsilon = 8,5 \times 10^3$$

=====

2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-schwefelsäurephenylester

50 mg DMPAP werden in 3 ml Pyridin gelöst und mit 0,5 ml Chlorsulfonsäure tropfenweise versetzt. Das Pyridin wird im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und mit 0,5N Natronlauge auf pH 6,5 eingestellt. Nach 3maligem Ausäthern (Ätherextrakte verwerfen) wird die wässrige Phase mit NaCl gesättigt und 3mal mit dem 10-fachen Volumen Chloroform extrahiert. Der Chloroformextrakt wird eingeeengt und präparativ dünnschichtchromatographiert. Fließmittel Äthylacetat-Methanol-Wasser (100+16, 5+13, 5). Die Substanz mit dem R_f-Wert von 0,3 wird mit Aceton eluiert und aus Methanol-Äther umkristallisiert.

Analyse siehe unter IV.2.c.

2-Dimethylamino-4-(methyl-²H₅-phenylamino)-phenol

Die Synthese erfolgte nach der oben beschriebenen Methode aus 2-Dimethylamino-phenol und N-Methyl-²H₅ anilin in deuterierten Lösungsmitteln. Das Dideuterochlorid der Substanz wurde durch Einleiten von DCl in eine Lösung der Substanz in Methanol-d₄ hergestellt. DCl wurde aus NaCl und D₂SO₄ gewonnen.

Die Identifizierung erfolgte im Vergleich mit der nicht deuterierten Verbindung.

^{14}C -markiertes 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol

Die Substanzen wurden aus radioaktiven Ausgangsmaterialien hergestellt. Es wurde an beiden aromatischen Ringen ^{14}C -markiertes und nur am 2-Dimethylamino-phenol-ring ^{14}C -markiertes DMPAP synthetisiert.

Radioaktives N-Methylanilin-ring- ^{14}C mit einer spezifischen Radioaktivität von 1,45 MC/mM und radioaktives 2-Dimethylamino-phenol-ring- ^{14}C mit einer spezifischen Radioaktivität von 2,65 MC/mM wurde von der Firma NEN Chemicals GmbH bezogen. Bei der Synthese der Substanzen wurde die Radioaktivität der Ausgangsmaterialien so bemessen, daß Verbindungen mit einer spezifischen Radioaktivität von etwa 0,1 MC/mM resultierten.

Die Radioaktivität des an beiden Ringen markierten DMPAP betrug 0,101 MC/mM; die der nur an einem Ring markierten Verbindung betrug 0,093 MC/mM.

2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-(3,5)-dinitrobenzoyl-phenylester

Die Synthese erfolgte nach EINHORN (46). 10^{-3} Mol (242 mg) DMPAP werden in 10 ml Pyridin gelöst und unter Eiskühlung mit 2,0 g 3,5-Dinitrobenzoylchlorid portionsweise versetzt. Die Reaktionsmischung wird zwei Stunden gerührt, in Eiswasser gegossen und mit konzentrierter Salzsäure angesäuert. Der sich abscheidende Ester wird mit wässriger Bicarbonatlösung gewaschen und aus wässrigem Aceton umkristallisiert.

Die gelb gefärbten Kristalle schmelzen bei $138,5^{\circ}\text{C}$.

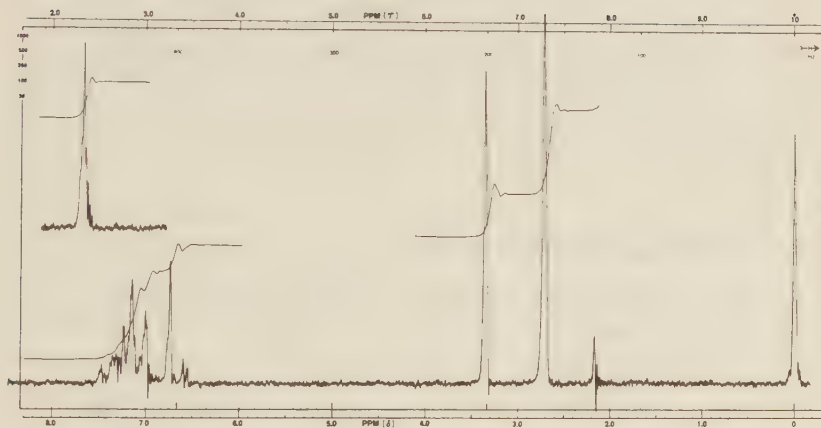
Ausbeute: 82%

$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}_4$ (436,4)

ber.	C	60,55	H	4,61	O	21,99	N	12,83
------	---	-------	---	------	---	-------	---	-------

gef.	C	60,44	H	4,70	O	22,16	N	12,74
------	---	-------	---	------	---	-------	---	-------

NMR-Spektrum in CDCl_3 , TMS int.



Protonenresonanz	Zuordnung
2, 74 ppm (6H/s)	$-\text{N}(\text{CH}_3)_2$
2, 52 ppm (3H/s)	$>\text{N}(\text{CH}_3)$
6, 7-7, 5 ppm (8H/m)	8 arom. H
9, 03 ppm (3H/s)	3 arom. H des 3, 5-Dinitro- benzoylrestes

Massenspektrum: (70 eV, ST 170°); $m/e = 436 (\text{M}^+)$

3, 5-Dinitrobenzamide von Methylamin, Dimethylamin, Anilin und N-Methylanilin (47, 62)

Die Synthese erfolgte nach SCHOTTEN - BAUMANN (46). 1, 0 g Amin wird mit 5, 0 g 3, 5-Dinitrobenzoylchlorid gemischt und mit 5 ml 2N Natronlauge versetzt. Das Gemisch wird geschüttelt bis kein Benzoylchloridgeuch mehr wahrzunehmen ist. Die sich aus dem Reaktionsgemisch abscheidenden Benzamide werden aus heißem Äthanol umkristallisiert.

Die Substanzen Anilin-d₅, N-Methylanilin, N,N-Dimethylanilin, 4-Bromanilin, 4-Fluoranilin, Methylamin-hydrochlorid, Dimethylamin-hydrochlorid, 4-Amino-diphenylamin, 3-Hydroxy-diphenylamin, 4-Dimethylamino-phenol und 3,5-Dinitrobenzoylchlorid waren Handelsprodukte. Sie wurden durch Destillation bzw. durch Umkristallisieren gereinigt.

2. Methoden, Materialien, Geräte

Die Bestimmung von Hämoglobin und Ferrihämoglobin erfolgte nach der Cyanidmethode von EVELYN, MALLOY (7) und HAVEMANN, JUNG, v. ISSEKUTZ (17). Ferrihämoglobin bildet mit Cyanid einen Komplex, der bei 550 nm maximal absorbiert. Zur Bestimmung wird die Zunahme der Extinktion nach Zugabe von Kaliumcyanid bei 550 nm gemessen.

Zur Bestimmung des Gesamtblutfarbstoffes (HbFe^{2+} und HbFe^{3+}) wird Hämoglobin (HbFe^{2+}) durch Kaliumferricyanidlösung zu Ferrihämoglobin (HbFe^{3+}) oxidiert.

Bestimmung von 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol

Die Substanz wurde in 1N salzsaurer Lösung mit 10%iger Kaliumdichromatlösung zu dem purpurnen Farbstoff oxidiert und durch Messung der Extinktion im Absorptionsmaximum bei 546 nm gemessen. Die Methode ist empfindlich. 9 μg ergeben bei 1 cm Schichtdicke eine Extinktion von 0,3.

Bestimmung von 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol im Blut

Zur Bestimmung des sich im Blut rasch umsetzenden 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenols mußte diese Umsetzung zum Zeitpunkt der Blutentnahme gestoppt werden. Dies gelang durch Zugabe von Natriumdithionit.

10 ml Blut wurden nach Entnahme zu 0,5 ml einer 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Lösung gegeben, umgeschüttelt, 5 min mit 15 ml Tetrachlorkohlenstoff extrahiert und anschließend zentrifugiert.

12 ml der Tetrachlorkohlenstofflösung wurden mit 3 ml 1N HCl 5 min ausgeschüttelt. 2 ml der salzsauren Phase wurden mit 0,05 ml einer wässrigen 10% Kaliumdichromatlösung versetzt. Die Extinktion des gebildeten purpurnen Farbstoffs wurde sofort im Absorptionsmaximum bei 546 nm gemessen.

Als Vergleich diente ein entsprechender Ansatz, dem keine Leukoverbindung zugegeben wurde.

Aus den ermittelten Extinktionen wurde mit Hilfe einer Eichgeraden die Konzentration von 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol im Blut bestimmt.

Bestimmung von Ferrihämoglobin

Versuche in vitro zur Kinetik der Ferrihämoglobinbildung wurden mit frischem Blut von Mensch, Hund, Rind und Kaninchen bei 37°C durchgeführt.

Die Substanz 2-Dimethylamino-4-(methyl-phenylamino)-phenol, 2-Dimethylamino-phenol und 4-Dimethylamino-phenol wurden als Hydrochloride in der Konzentration zum Blut zugegeben, so daß eine 4×10^{-4} molare Lösung entstand.

In Zeitabständen von 1, 3, 5, 10, 20, 40 und 60 min wurden je 0,1 ml Blut entnommen und Ferrihämoglobin nach der beschriebenen Methode bestimmt.

Die präparative Dünnschichtchromatographie erfolgte auf DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254} (Merck), Schichtdicke 0,25 und 0,5 mm.

Die Radioaktivität auf Dünnschichtplatten wurde mit dem Dünnschicht-Scanner II (Lab. Prof. Dr. Berthold, 7574 Wildbad) gemessen.

Die Radioaktivität in Lösungen (Harn etc.) wurde im Dioxan-Naphthalin Scintillator gemessen.

Ansatz:

1, 4-bis-2-(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol (POPOP)	200 mg
Naphthalin	60 g
2, 5-Diphenyloxazole (PPO)	4 g
Methanol	10 ml
Äthylenglykol	20 ml
Dioxan	ad 1000 ml

0, 1 ml der radioaktiven Lösung wurde zu 15 ml Dioxan-Naphthalin Scintillator-gemisch gegeben.

Die Radioaktivität im Blut und im Gewebehomogenat wurde mit dem INSTA-GEL Scintillator (Packard) nach folgender Methode gemessen:

0, 1 ml Probe

1, 5 ml Soluene-100 (Packard)/Isopropanol 1:1

0, 5 ml Wasserstoffperoxid 30%

30 min bei Raumtemperatur stehen lassen, dann

15 ml Insta-Gel (Packard)/0, 5N Salzsäure (9+1)

Gezählt wurde die Radioaktivität im TRI CARB liquid Scintillation Spectrophotometer Modell 3385 der Firma Packard.

Inkubation des Harns unter N_2 bei $37^{\circ}C$, sowie pH 5, 0 und 6, 8,

ß-Glucuronidase von Sigma 105-8 500 000 Einheiten/g,

Phenolsulfatase von Sigma S-9626 100 000 Einheiten/g,

ß-Glucuronidase Sulfatase "Suc d'Helix pomatia" (Industrie Biologique Française).

Extinktionskurven im sichtbaren und ultravioletten Bereich wurden mit dem Cary Recording Spectrophotometer, Modell 118, (Varian) aufgenommen.

IR-Spektren wurden in KBr und in verschiedenen Lösungsmitteln mit dem Perkin Elmer Infrarot Gitterspectrophotometer 225 im Max-Planck-Institut für Biochemie und mit dem Perkin Elmer Infrarot Gitterspectrophotometer 257 im Pharmakologischen Institut aufgenommen.

Die ESR-spektrometrischen Untersuchungen wurden am X-Band Spektrometer (Brucker mit Varianresonator) bei einer Mikrowellenleistung von 2 mWatt und einer Modulationsamplitude von 8 Oe bei der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg, durchgeführt.

Die Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer SM-1A von Varian im Max-Planck-Institut für Biochemie und mit dem Massenspektrometer AEI MS-30 im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München aufgenommen.

Die NMR-Spektren wurden mit BruckerSpektrospin im Max-Planck-Institut für Biochemie und mit dem Varian A 60-A im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre angefertigt.

Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroskopheiztisch 350 von Leitz bestimmt.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. AFANASSIEW, M.
Über Icterus und Hämoglobinurie, hervorgerufen durch Toluylen-
diamin und andere Blutkörperchen zerstörende Agentien
Z.klin. Med. 6, 281 (1883)
2. ALBAUM, H. G., TEPPERMAN, J., BODANSKY, O.
A spectrophotometric study of the competition of methemoglobin
and cytochrome oxidase for cyanide in vitro
J. biol. Chem. 163, 641 (1946)
3. DELGA, J.
Action de la méthémoglobine sur la cytochrome-oxydase inhibée
per les cyanures
Ann. pharm. franc. 10, 407 (1952)
4. DUBOIS, R., VIGNON, L.
Etude préliminaire de l'action physiologique de la para et de la
métaphénylènediamine
Arch. de physiol. 20, 255 (1888)
5. DUBOIS, R., VIGNON, L.
Sur l'action physiologique de la para- et de la métaphénylènediamine
Compt. rend. Acad. d. sc. 107, 533 (1888)
6. ERDMANN, E., VAHLEN, E.
Über die Wirkungen des p-Phenylendiamins und Chinondiamins
Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 53, 401-418 (1905)
7. EVELYN, K. A., MALLOY, H. T.
Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulf-
hemoglobin in a single sample of blood
J. biol. Chem. 126, 655 (1938)

8. EYER, P., KIESE, M., WEGER, N.
Metabolism of 4-Dimethylaminophenol
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 270, R 29 (1971)
9. EYER, P., KIESE, M., LIPOWSKY, G., WEGER, N.
Reactions of 4-Dimethylaminophenol with Hemoglobin and
Autoxidation of 4-Dimethylaminophenol
Chem. Biol. Interactions 8, 41-59 (1974)
10. EYER, P., KIESE, M., WEGER, N.
The Reactions of 4-Dimethylaminophenol with Hemoglobin
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 277, R 16 (1973)
11. FISCHER, O.
Zur Kenntnis der Orthodiamine
B. dtsh. chem. Ges. 25, 2826-47 (1892)
12. FISCHER, O., HEPP, E.
Zur Kenntnis der Nitrosamine
B. dtsh. chem. Ges. 19, 2991-95 (1886)
13. FISCHER, O., HEPP, E.
Zur Kenntnis der Nitrosamine II
B. dtsh. chem. Ges. 20, 1247-53 (1887)
14. FRIEDLÄNDER
Verfahren zur Darstellung von p-Phenylendiaminmonosulfon-
säuren
Fortschritte der Teerfarbenfabrikation 9, 118-119 (1908-1910)
15. FRIEDLÄNDER
Verfahren zur Darstellung von Natriumaminverbindungen,
gegebenfalls vermischt mit Kaliumaminverbindungen aus
primären oder sekundären aromatischen Aminen
Fortschritte der Teerfarbenfabrikation 9, 121-123 (1908-1910)

16. HANZLIK, P. J.
The Pharmacology of Some Phenylenediamines
J. ind. Hyg. Toxicol. 4, 386-409 (1923)

17. HAVEMANN, R., JUNG, F., v. ISSEKUTZ, B.
Die Bestimmung von Methemoglobin im Blute mit dem
lichtelektronischen Kolorimeter
Biochem. Z. 301, 116 (1939)

18. HEUBNER, W., JUNG, F.
Über eine Katalyse durch Methämoglobin (Hämoglobin)
B. dtsh. chem. Ges. 75, 1636 (1942)

19. HUISGEN, R., BAYERLEIN, F., HEYDKAMP, W.
Die Acylierung der N,N-Dimethyl-arylaminoxyde; der
Mechanismus der Polonovski-Reaktion
Chem. Ber. 92, 3223 (1959)

20. HUISGEN, R., HEYDKAMP, W., BAYERLEIN, F.
Zur Reaktion der N,N-Dimethyl-arylamine mit Diacyl-
peroxiden; der Mechanismus der Entmethylierung
Chem. Ber. 93, 363 (1960a)

21. HÜNIG, S.
Über die Methylierung von aromatischen Aminen mit
Dimethylsulfat
Chem. Ber. 85, 1056 (1952)

22. HUG, E.
L'action combinée de divers antidotes de l'acide cyan-
hydrique spécialement du nitrite et de l'hyposulfite de soude
C. r. Soc. Biol. 115, 462 (1933b)

23. JUNG, F.
Studien über Methämoglobinbildung
XXIX. Mitteilung. Chlor- und Amino-Nitrobenzole
Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 204, 134-138 (1947)
24. KIESE, M. SEIPELT, L.
Bildung und Elimination von Verdoglobinen
Arch. exp. Path. Pharmacol. 200, 648 (1943)
25. KIESE, M., MENZEL, H.
Hämoglobinbildung im Blute des Menschen nach Einnahme
von Phenacetin und N-acetyl-p-aminophenol
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharm. exp. Path. 242, 511 (1962)
26. KIESE, M., PEKIS, M.
The Reaction of p-Aminophenol With Hemoglobin and Oxygen
in Vivo and in Vitro
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharm. exp. Path. 246, 413 (1964)
27. KIESE, M. RACHOR, M.
The Reaction of Several Aminophenols With Hemoglobin
and Oxygen in Vitro and in Vivo
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharm. exp. Path. 249, 225 (1964)
28. KIESE, M., WEGER, N.
Hämoglobinbildung zur Behandlung der Cyanidvergiftung
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. 250, 263 (1965)
29. KIESE, M., WEGER, N.
The Treatment of Experimental Cyanide Poisoning by
Hemoglobin Formation
Arch. Toxicol. 21, 89 (1965)

30. KIESE, M.
The Biochemical Production of Ferrihemoglobin Forming
Derivatives From Aromatic Amines, and Mechanism of
Ferrihemoglobin Formation
Pharmacol. Rev. 18, 1091 (1966)
31. KIESE, M., RAUSCHER, E., WEGER, N.
The Role of N,N-Dimethylaniline-N-Oxide in the Formation
of Hemoglobin Following the Absorption of N,N-Dimethylaniline
Arch. exp. Path. u. Pharmacol. 254, 253 (1966)
32. KIESE, M.
Reactions of N,N-Dimethylaniline-N-Oxide With Hemoglobin
Molec. Pharmacol. 3, 9 (1967)
33. KIESE, M., RACHOR, M., RAUSCHER, E.
The Absorption of Some Phenylenediamines Through the
Skin of Dogs
Toxicol. Appl. Pharmacol. 12, 495 (1968)
34. KIESE, M., WEGER, N.
Formation of Ferrihemoglobin With Aminophenols in the
Human for Treatment of Cyanide Poisoning
European J. Pharmacol. 7, 97 (1969)
35. KIESE, M., RENNER, G., SCHLÄGER, R.
Mechanism of the Autocatalytic Formation of Ferrihemoglobin
by N,N-Dimethylaniline-N-Oxide
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 268, 247-263 (1971)
36. KOBERT, R.
Über Cyanmethämoglobin und den Nachweis der Blausäure
Stuttgart, 1891

37. KOHLER, L.
Über m-Oxynitrosodiphenylamin
B. dtsch. chem. Ges. 21, 908-910 (1888)
38. LAYER, R. W.
Reaction of Ozone With p-Phenylenediamine and Related
Compounds
Rubber Chemistry a. Technology 39(5), 1584-1592 (1966)
39. LEONARD, N. J., SUTTON, L. E.
The Use of Fluoro Compounds in the Determination of
Valency Angles by Electric Dipole Moment Measurements
Am. Soc. 70, 1564-71 (1948)
40. LÖRCHER, W., WEGER, N.
Optimal Concentration of Ferrihemoglobin for the Treatment
of Cyanide Poisoning
Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 270, R 88 (1971)
41. MATSUMOTO, H.
Über die Giftwirkung des Paraphenylendiamins
Diss. Med. Würzburg, 1901
42. MAYER, R. L.
Über die Hautüberempfindlichkeit gegen Körper von
Chinonstruktur
Klin. Wsch. 7, 1958-59 (1928)
43. MAYER, R. L., FÖRSTER, M.
Ursolschäden in der Rauchwarenindustrie
Zbl. Gewerbehyg. 6, 171 (1929)

44. MEYER, R., MAIER, J.
Über einige alkylierte Azokörper. Ein Beitrag zur
Theorie des Färbens
B. dtsh. chem. Ges. 36, 2970-82 (1903)
45. NEBER, P.W., RAUSCHER, H.
Der Reaktionsverlauf der O. Fischer-Heppschens "Umlagerung"
der Nitrosamine
Liebig's Annalen d. Chemie 550, 182-95 (1942)
46. ORGANIKUM
VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin
9. Auflage S. 377
47. PARITZ, D.
N-Substituted-3, 5-Dinitrobenzamides
Dr. Salsbury's Laboratories Brit. 866, 516, Apr. 26 (1961)
48. PICCARD, J.
Dimethyl-Diphenyl-p-Phenylenediamine and the Color of
Monosalts and Bisalts of Holoquinonic Compounds
J. Am. Chem. Soc. 48, 1356-57 (1926)
49. PINNOW, J.
Darstellung reiner tertiärer Aniline und tetraalkylierter
aromatischer Amine
B. dtsh. chem. Ges. 32, 1401-09 (1899)
50. RENNER, G.
Mechanismus der autokatalytischen Bildung von Ferri-
hämoglobin durch Dimethylanilinoxid
Habilitationsschrift, München 1972

51. RENNER, G.
Reactions of 4-Halogeno-N, N-Dimethylaniline-N-Oxide
With Hemoglobin
(1975 in Vorbereitung)
52. RICE, R. G. , KELLER, G. J. , KIRCHNER, J. G.
Separation and Identification of 2, 4-Dinitrophenylhydrazones
of Aldehyds and Ketones, and 3, 5-Dinitrobenzoates of Alcohols
by Filter-Paper Chromatography
Analytical Chemistry 23, 194 (1951)
53. SCHUBERT, J. , BRILL, W. A.
Antagonism of Experimental Cyanide Toxicity in Relation
to the in Vivo Activity of Cytochrome Oxidase
J. Pharmacol. exp. Ther. 162, 352 (1968)
54. STADELMANN, E.
Die chronische Vergiftung mit Toluylendiamin. Weitere
Beiträge zur Lehre vom Ikterus
Arch. exp.Path. Pharmak. 23, 427 (1887)
55. STAHL, K. E. , JUNG, F.
Über Blutgiftwirkungen des Phenylendiamins und des
Toluylendiamins
Arch. exp.Path. Pharmak. 220, 503-518 (1953)
56. STAHL, E. , SCHORN, P. J.
Amine und Teerbasen
Egon Stahl, Dünnschichtchromatographie S. 470-82
Springer-Verlag (1967)
57. SZIGETI, H.
Über Cyanhämatin
Viertelj. Schr. Ger. Med. 6, 9 (1893)

58. TERAYAMA, H.
Aminoazo dye amino-oxide as a possible intermediate
metabolite preceding N-demethylation and orthohydroxylation,
as well as azo dye-protein binding
Acta Un. Int. Caner. 19, 534 (1963)
59. TERAYAMA, H.
Amino dye amino-oxide as a possible intermediate
metabolite preceding N-demethylation and orthohydroxylation,
as well as azo dye-protein binding
Gann 54, 195 (1963)
60. UEHLEKE, H., STAHN, V.
Zur biologischen Bildung von N,N-Dimethylanilin-N-oxyd
und N,N-Dimethylaminoazobenzol-N₄-oxyd aus den Aminen
sowie ihre Reaktionen mit Hämoglobin und mit Lebermikrosomen
Arch. Pharmak. exp. Path. 225, 287 (1966)
61. ULLMANN, F.
Über Arylanthranilsäuren
Annalen der Chemie 355, 312 (1907)
62. VECERA, M., VOLAKOWA, B., KOZAKOWA, M., JURECEK, M.
Identification and Separation of Aliphatic Primary Amines as
N-alkyl-3, 5-dinitrobenzamides
Collection Czechoslov. Chem. Commun 25, 1281-6 (1960)
63. WEGER, N.
Aminophenole als Blausäureantidote
Arch. Toxicol. 24, 49 (1968)
64. WEGER, N.
Therapie der Blausäurevergiftung durch Ferrihämoglobinbildung
Med. Habilitationsschrift, München, 1969

65. WEGER, N. und Mitarbeiter
Wirkung des 4-Dimethylamino-phenols und 4-Amino-phenols
auf Organe von Hunden und Ratten
(1975 in Vorbereitung)
66. WIELAND, H.
Zur Oxidation der sekundären und tertiären aromatischen Amine
B. dtsh. chem. Ges. 52, 890-91 (1919)
67. WURSTER, C.
Über die Methylderivate des p-Phenylendiamins
B. dtsh. chem. Ges. 12, 522-530 (1879)

Herrn Professor Dr. med. Manfred Kiese, Direktor des Pharmakologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München, auf dessen Anregung hin diese Arbeit angefertigt wurde, und der die Durchführung dieser Dissertation ermöglichte, danke ich für sein stetes Interesse und die guten Arbeitsbedingungen am Institut.

Herrn Professor Dr. H. Wagner, Direktor des Instituts für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für das Korreferat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. G. Renner für die jederzeit gern gewährte Unterstützung und für seine wertvollen Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit.

Frl. G. Schild vom Max-Planck-Institut für Biochemie München, und Herrn O. Seligmann vom Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre München, danke ich für die Aufnahme der NMR- und Massenspektren; Herrn Dr. H. Lotter, Max-Planck-Institut für Biochemie München, für die Röntgenstrukturanalyse und Herrn Dr. U. Deffner, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung München, für die Aufnahme der ESR-Spektren.

Herrn Dr. J. Sonnenbichler, Max-Planck-Institut für Biochemie München, danke ich für die Diskussion der Massenspektren.

Herrn Dr. med. L. Szinicz danke ich für die mikroskopische Untersuchung der Organschnitte.

LEBENS LAUF

HARALD GABER geboren am 4. 9. 1944 in Ulm/Donau als
Sohn des Korvettenkapitäns Karl Gaber
und seiner Ehefrau Ilse, geb. Hölzinger

SCHULEN 1951-1955 Volksschule in Ulm/Do
1955-1965 Kepler-Gymnasium in Ulm/Do
Reifeprüfung: Februar 1965

BUNDESWEHR April 1965 - März 1967

BERUFSAUSBILDUNG April 1967 - März 1969 Pharmazeutisches
Praktikum in der Engel-Apotheke, Pächter
Dr. W. Klein, in Ulm/Do
Vorexamen Pharmazie: März 1969

SS 1969-WS 1971/72 Studium der Pharmazie
an der Universität München
Staatsexamen Pharmazie: April 1972

Seit Juli 1972 arbeite ich unter Anleitung von Professor Dr. med. M.
Kiese und Privatdozent Dr. rer. nat. G. Renner am Pharmakologischen
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München an der vorliegenden
Dissertation.

